

## Capítulo 5

### Los hongos entomopatógenos y sus proteínas insecticidas en el control de plagas de insectos

Quesada-Moraga E<sup>1</sup>, Ortiz-Urquiza A, Garrido-Jurado I, Muñoz-Ledesma FJ, García-Fernández P<sup>2</sup>, Santiago-Álvarez C<sup>2</sup>

Dep. Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Campus de Rabanales, Edificio C4 "Celestino Mutis", Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>2</sup>Área de la Producción Agraria, IFAPA Camino del Purchil, C/. Camino del Purchil s/n, CAP, Junta de Andalucía, 18071 Granada; CE: <sup>1</sup><cr2qumoe@uco.es> y <sup>2</sup><cr1saalc@uco.es>

#### RESUMEN

El desarrollo de hongos entomopatógenos para el control de plagas de insectos ha experimentado en los últimos años un considerable progreso. El empleo de estos agentes de control biológico presenta numerosas ventajas, seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reducción de la presencia de residuos insecticidas en los alimentos e incremento de la biodiversidad del medio. Los hongos son únicos y sobresalientes entre los microorganismos entomopatógenos porque infectan a los hospedantes a través del tegumento, acción por contacto, lo que les confiere ventaja para el control de varios grupos de insectos fitófagos de gran relevancia en la agricultura mediterránea. Sin embargo, un empleo más eficiente y generalizado de estos agentes en el control depende en gran medida de la mejora de su velocidad de acción, reducción de los tiempos letales. Algunas cepas fúngicas secretan proteínas insecticidas durante el desarrollo de la infección, que se postulan entre las mejores dianas para la selección y mejora biotecnológica a efectos de control, así como una fuente inexplorada de nuevas moléculas insecticidas de origen natural. El Grupo AGR 163 "Entomología Agrícola" de la Universidad de Córdoba dispone de una colección de más de 300 aislados autóctonos de los ascomicetos mitospóricos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* procedentes de suelos de la Península Ibérica y archipiélagos Canario y Balear, que es una buena base para la selección de aislados que produzcan *in vitro* proteínas insecticidas, para (1) estudiar su desarrollo como micoinsecticidas; (2) determinar si la secreción de estas proteínas ocurre también *in vivo* y su función como determinantes de virulencia; (3) evaluar el posible empleo de estas proteínas como nuevas moléculas insecticidas de origen natural; (4) desarrollar marcadores moleculares que permitan identificar los aislados más importantes y detectar los genes que codifican para esta proteínas, para la posible mejora genética.

Palabras clave: enfermedades de insectos, Ascomycota, Hypocreales, Entomophthorales, aislamiento, bioensayo, diversidad genética, cromatografía líquida, proteómica, ITS, IGS.

#### Introducción

La presencia de gran cantidad de plantas similares en extensas áreas, monocultivo, es la estampa de la Agricultura moderna. Esta práctica ha permitido al hombre dar satisfacción a las necesidades en alimentos y fibras de una población mundial en continua expansión demográfica, pero en el aspecto ecológico es una situación artificial, intrínsecamente inestable como consecuencia de las oportunidades que ofrece para la agresiva invasión de insectos y ácaros fitófagos, nematodos, hongos y otros microorganismos fitopatógenos.

Una serie muy diversa de prácticas fitosanitarias aplicadas en los sistemas agrícolas con la finalidad de proteger a los cultivos de los daños causados por este conjunto de enemigos, paliar las consecuentes pérdidas de producción, que se estima superan el nivel del 33%.

El empleo de insecticidas se considera efectivo, cuando se alcanza el efecto biocida deseado, y económico, cuando los beneficios de la aplicación superan el coste de la misma, sin embargo plantean serios interrogantes sobre la sostenibilidad de este tipo de Agricultura, donde

su liberación ha crecido alrededor de un 1900% desde 1930, por su incidencia en la salud pública y en el medio. Pero en la actualidad no existen demasiadas alternativas al monocultivo, y la población mundial y sus necesidades de alimento siguen creciendo, por lo que los científicos deben intensificar la búsqueda de nuevos métodos de Control de Plagas de Insectos que satisfagan los requisitos de eficacia, bajo coste y de mínimo impacto medioambiental.

El Control Biológico de Plagas de Insectos cumple los requisitos de seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reduce la presencia de residuos insecticidas en los alimentos e incrementa la biodiversidad del medio, por lo que en la actualidad existe cierta "urgencia" para el desarrollo de Agentes de Control Biológico como gran alternativa a los insecticidas químicos de síntesis.

#### Los Hongos Entomopatógenos en el Control Microbiano de Plagas

El empleo de hongos entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas de Insectos de Interés Agrícola, Forestal y Médico-Veterinario, e incluso Urbano, ha experimentado en los últimos años un considerable

progreso revelado por el número de productos comerciales disponibles y en desarrollo (Quesada-Moraga, 2002; Charnley y Collins, 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008), debido a que los hongos entomopatógenos están presentes de forma natural en el suelo, y en las poblaciones de insectos, que en cierta medida regulan, pero sobre todo, a que **son únicos y sobresalientes entre los microorganismos entomopatógenos por actuar por contacto**, pues infectan al hospedante a través del tegumento.

Los propágulos de infección, las conidias, se adhieren a la cutícula, germinan y forman estructuras específicas de penetración por medio de las cuales el hongo alcanza el hemocele donde crece, vencidas las respuestas defensivas, celular y humoral, del insecto hospedante. La muerte de éste puede ser debida a la exhaustación de los nutrientes que le pone a disposición, la invasión de sus tejidos y órganos, la asfixia al desarrollarse en el sistema respiratorio, y en algunos casos, a la producción de metabolitos tóxicos.

Acabada la muerte del insecto el hongo crece de modo saprofito y en condiciones de humedad y temperatura favorables, las hifas emergen del cadáver, se produce la esporulación y la liberación de las conidias que posibilitan el inicio de un nuevo ciclo por transmisión horizontal.

Al penetrar por vía tegumentaria, los hongos entomopatógenos resultan idóneos para el control biológico de insectos con aparato bucal picador-chupador (Tisanópteros y Hemípteros) (Quesada-Moraga et al, 2006c), de aquellos con aparato bucal masticador entre los que no se conocen enfermedades de etiología viral o bacteriana (algunos Lepidópteros y Coleópteros) (Marannino et al, 2006, 2008a,b), o éstas no son eficaces como ocurre con langostas, saltamontes o cucarachas (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997; Quesada-Moraga et al, 2004; Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2008), para insectos del suelo (Quesada-Moraga et al, 2006d; Marannino et al, 2006; 2008b; Quesada-Moraga et al, 2008), e incluso para algunos parásitos animales de gran importancia como *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), parásito de la abeja melífera *Apis mellifera* (García-Fernández et al, 2008a,b).

Las 700 especies de hongos entomopatógenos conocidas hasta la fecha tienen desigual importancia para su desarrollo comercial y aplicación en control microbiano, aquellas que resultan idóneas para este fin por su frecuente aparición en las poblaciones naturales de insectos, su presencia y persistencia en el suelo, su amplio espectro de hospedantes, y su gran efecto insecticida, pertenecen a los géneros *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* ahora adscritos a los ascomicetos.

La presencia natural de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* ha sido ampliamente constatada para todo el territorio nacional, Península y Archipiélagos, sobre insectos y en el suelo, tanto ecosistemas naturales como cultivados (Santiago-Álvarez, 1991; Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997; Maranhao y Santiago-

Álvarez, 2003; Quesada-Moraga et al, 2007).

### **Formulaciones y Estrategias de Aplicación Adecuadas Permiten Explotar al Máximo el Potencial de los Hongos Entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos pueden ser empleados de manera **inoculativa**, aplicación puntual del inóculo para iniciar ciclos de enfermedad, establecer el hongo en la población del insecto y mantener el control a largo plazo; de manera **inundativa**, es la aplicación de un insecticida microbiano, para iniciar una epizootia conducente al declive de la población en un tiempo relativamente corto. La eficacia insecticida de los hongos entomopatógenos depende de su virulencia y persistencia, así como de algunas características del insecto tales como el estado contra el que se realiza la aplicación, o la existencia de otros factores de estrés en el momento de realizarla. Pero el éxito de un micoinsecticida está condicionado en gran medida por distintos factores ambientales, en lo que la formulación juega un papel fundamental p. e. evitar la rápida inactivación por la radiación ultravioleta del espectro solar (285-315 nm).

Además, a los hongos se les reconoce un gran potencial para el control microbiano de insectos del suelo (Marannino et al, 2006; 2008b; Quesada-Moraga et al, 2006d), medio privilegiado que les protege de este y otros factores críticos.

Las cepas seleccionadas para la producción de micoinsecticidas deben tener óptimos térmicos adaptados a los hospedantes y hábitats donde van a ser empleadas (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997; Quesada-Moraga et al, 2006c), y aunque siempre se ha considerado el grado de humedad relativa como un factor limitante, en la actualidad se sabe que son las condiciones microclimáticas en la superficie de la cutícula, en el substrato vegetal o edáfico, suficientes para desencadenar el proceso de infección. La humedad relativa por otro lado es también importante para la conidiogénesis en los cadáveres, lo que favorece la transmisión horizontal del hongo, y en último término la eficacia del control (Quesada-Moraga et al, 2004, 2008).

Los hongos entomopatógenos presentan además propiedades excepcionales para el control de especies endófitas. Un caso sorprendente es el adecuado control de *Timaspis papaveris* (Kieffer) alcanzado por aplicación de *B. bassiana* sobre plantas de adormidera (Quesada-Moraga et al, 2006b), lo que se debe a la capacidad de las hifas del hongo para penetrar en las hojas, seguir la vía del apoplasto en todas direcciones, e incluso alcanzar el xilema (Quesada-Moraga et al, 2006b, 2009).

### **Desarrollo Comercial de Micoinsecticidas**

El desarrollo comercial de un micoinsecticida requiere una etapa inicial en la que resulta decisiva la selección de la cepa fúngica más activa, contra un determinado hospedante, de entre las obtenidas de las dos fuentes de hongos entomopatógenos que nos proporciona la naturaleza, a saber, insectos infectados en campo y el

suelo. Esta evaluación se realiza siempre en condiciones de laboratorio.

El Grupo PAI de Investigación AGR-163 "Entomología Agrícola" de la Universidad de Córdoba dispone en la actualidad de un considerable número de aislados autóctonos de hongos entomopatógenos, fruto de una continuada labor de aislamientos iniciada en 1978 (Santiago-Álvarez, 1991), algunos de los cuales han mostrado acción insecticida por bioensayos clásicos, para especies de Ortópteros, Homópteros (Hernández-Crespo y Santiago-Álvarez, 1997; Santiago-Álvarez et al, 2002; Maranhao, 2003; Quesada-Moraga y Vey, 2003; Quesada-Moraga et al, 2006c; Santiago-Álvarez et al, 2006), Coleópteros (Marannino et al, 2008a,b) y Dípteros (Quesada-Moraga et al, 2006d, 2008), aunque el potencial que encierra para su explotación práctica puede continuar explorándose en el futuro.

En paralelo, deben realizarse estudios de ecología, fisiología y genética (Quesada-Moraga et al, 2006c; Márquez et al, 2006), que resultan indispensables para la futura comercialización y registro. Estos trabajos nos proporcionarán información para diseñar las mejores estrategias de producción en masa y formulación, y nos permitirán disponer de marcadores para seguir la evolución de las cepas en el medio natural, evaluar su eficacia y realizar estudios de impacto ambiental. Con un conocimiento de base de la actividad insecticida de las cepas en condiciones de laboratorio, y de sus características de crecimiento, óptimo térmico, etc (Quesada-Moraga et al, 2006c), podemos afrontar su evaluación en campo. Además, debe evaluarse el impacto del producto sobre la fauna útil, que a tenor de nuestros datos actuales, parece ser muy bajo (Garrido-Jurado et al, 2007). Para completar los estudios de seguridad debemos dilucidar la toxicidad de la cepa sobre mamíferos, su efecto alergénico y la producción de toxinas inespecíficas, sin olvidar el posible desplazamiento competitivo de otros entomopatógenos presentes de forma natural en el medio. Cuando un aislado cumple todos estos requisitos, estamos en disposición de desarrollarlo comercialmente, de acuerdo con los más estrictos criterios económicos, pues de eso depende que el micoinsecticida alcance el mercado como una gran alternativa a los insecticidas químicos de síntesis.

Esta secuencia ya ha sido completada para uno de nuestros aislados fúngicos de *B. bassiana*, de inminente aparición en el mercado con el nombre comercial BECAN<sup>®</sup>, comercializado por la empresa sevillana Newbiotechnic para el control de moscas blancas en invernadero, *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*.

Las secreción de proteínas insecticidas por los Hongos Entomopatógenos: factores de virulencia y nueva fuente de moléculas insecticidas de origen natural

A pesar de la gran atención que suscita en la actualidad el empleo de micoinsecticidas (existen más de 60 productos comerciales a nivel mundial), la percepción general es que no actúan con tanta rapidez como los insecticidas químicos de síntesis, posible causa de que sólo

alcanzasen el 1-2% del total del mercado mundial de productos fitosanitarios en 2006, aunque esa tendencia se está invirtiendo debido a la creciente sensibilización hacia el medioambiente. Una limitación al desarrollo de micoinsecticidas viene impuesta por el hecho de requerir entre 5 y 10 días después de la aplicación para reducir la población del insecto fitófago, intervalo durante el que puede causar daños serios al cultivo. Por tanto, para garantizar que los hongos entomopatógenos sean una verdadera alternativa a los insecticidas químicos convencionales, resulta fundamental mejorar su virulencia, tiempos letales, y período de tiempo comprendido entre la aplicación y el cese de alimentación del insecto hospedante.

Hasta la fecha, la mejora de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico ha consistido en la explotación de tecnologías que optimizan la producción en masa, la estabilización y su aplicación con maquinaria convencional. En cambio, los resultados obtenidos respecto a la mejora de los tiempos letales y de la virulencia no son los deseados, lo que hace necesaria la búsqueda de otras estrategias de mejora, que unidas a las citadas tecnologías, aumenten su eficacia comercial. Esto sólo puede conseguirse si desvelamos las bases moleculares de su patogenicidad, para potenciarlas durante la producción en masa, formulación y aplicación, y como blancos idóneos para la mejora genética (Leger y Screen, 2001). Recientemente se ha señalado también la importancia de los factores de virulencia denominados de forma genérica **metabolitos tóxicos o metabolitos insecticidas** (Vey, 1998), cuya relevancia previamente apuntada por Roberts (1981), ha alcanzado especial significación en la última década (Vey et al, 2001). Se conocen dos grandes grupos de metabolitos insecticidas (Vey et al, 2001); los de bajo peso molecular (aprox. <5 kDa), denominados también metabolitos secundarios, que son sintetizados en su mayor parte en grandes complejos multienzimáticos citoplásmicos y no en ribosomas, lo que limita su estudio a nivel molecular y su empleo como blanco para la mejora genética (Vey, 1998). El segundo tipo de metabolitos insecticidas son los **metabolitos proteínicos macromoleculares** (> 5-10 kDa), cuya función exacta en el proceso patogénico permanece sin aclarar, aunque hay evidencias que los relacionan directamente con la muerte del insecto o bien con la supresión de su sistema inmunitario (Liu et al, 1996). Estas proteínas son consideradas un gran blanco para la selección y mejora de hongos entomopatógenos, y además constituyen una fuente inexplorada de moléculas naturales insecticidas (Vey, 1998; Vey et al, 2001; Quesada-Moraga et al, 2006a). Se conocen hasta el momento dos proteínas insecticidas de este tipo, la **hirsutelina A** (Mazet y Vey, 1995), producida por *Hirsutella thompsonii* Fisher, hongo que regula de forma natural las poblaciones del ácaro *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead en Florida, que ya ha sido clonada (Boucias et al, 1998), y asociada al proceso patogénico (Maimala et al, 2002), y la **bassiacridina**, secretada por un aislado de *B. bassiana*, y que es específica de langostas, a lo que debe su nombre (Quesada-Moraga y Vey 2003; 2004).

La selección de aislados de hongos entomopatógenos

cuya acción patogénica esté asociada a la producción de una o varias proteínas insecticidas presenta numerosas ventajas. Su mejora es posible por optimización de su capacidad secretora (Quesada-Moraga y Vey, 2003), pero también, la investigación sobre los genes que codifican estas proteínas, podría permitir la obtención de cepas mejoradas mediante técnicas clásicas como mutagénesis, fusión de protoplastos, o mediante ingeniería genética (Viaud et al, 1996; Leger y Screen, 2001). Además, la detección de proteínas fúngicas que presenten una gran acción insecticida por ingestión puede servir de acicate para su empleo como nuevas moléculas insecticidas de origen natural (Quesada-Moraga et al, 2006d; Ortiz-Urquiza et al, 2009).

Por tanto, la selección de cepas cuya actividad insecticida esté asociada a la producción de proteínas insecticidas presenta numerosas ventajas para el desarrollo de micoinsecticidas que alcance el mercado de forma competitiva. La diversidad genética incluida en la micoteca del Grupo AGR 163 "Entomología Agrícola" ofrece importantes perspectivas para la selección de aislados que por ser productores de proteínas insecticidas puedan ser mejorados como se ha referido más arriba, además de proporcionar una fuente inexplorada de nuevas moléculas insecticidas de origen natural (Quesada-Moraga et al, 2006a).

### Agradecimientos

Financiado por el MEC Proyecto AGL2004-06322-C02, por la Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía Corporación Tecnológica de Andalucía (Exp. N° 830902), por la Empresa Pública de Desarrollo Agrario y Pesquero de la Junta de Andalucía (DAP) Proyectos DAP-9216211-35 y DAP-9216211-36, por Newbiotechnic, Alcaliber y Grupo PAI AGR-163 (Junta de Andalucía).

### Referencias

- Boucias DG, Farmerie WG, Pendland JC (1998): Cloning and sequencing of cDNA of the insecticidal toxic Hirsutellin A. *J Invertebr Pathol* 72: 258-251.
- Charnley AK, Collins SA (2007): Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: "Environmental and Microbial Relationships". Springer (Berlin): 159-187.
- García Fernández P, Rivera González MC, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E (2008a): Hongos entomopatógenos frente a *Varroa destructor*. *Vida Apícola* 149: 35-43.
- García-Fernández P, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E (2008b): Pathogenicity and thermal biology of mitosporic fungi as potential microbial control agents of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39:662-673.
- Garrido-Jurado I, Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E, Campos M (2007) Assessing the effect of soil treatment with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin against puparia of *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae) on soil dwelling non target arthropods. *3rd European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group Integrated Protection of Olive Crops*: 83.
- Hernández-Crespo P, Santiago-Álvarez C (1997): Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the moroccan locust *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera, Gomphocerinae) and other acridoidea in Spain. *Biocontrol Sci Technol* 7: 357-363.
- Leger RS, Screen S (2001): Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds): "Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential". CABI publishing (Wallingford): 7219-238.
- Liu JC, Boucias DG, Pendland JC, Liu WZ, Maruniak J (1996): The mode of action of Hirsutellin A on Eukaryotic Cells. *J Invertebr Pathol* 67: 224-228.
- Maimala S, Tartar A, Boucias DG, Chandrapatya A (2002): Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. *J Invertebr Pathol* 80: 112-126.
- Maranhao E (2003): Utilización de hongos entomopatógenos para el control de "moscas blancas" (Homoptera, Aleyrodidae) en cultivos hortícolas. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Maranhao EAA, Santiago-Álvarez C (2003): Occurrence of entomopathogenic fungi in soils from different parts of Spain. *IOBC/wprs Bull* 26: 59-62.
- Marannino P, Santiago-Alvarez C, De Lillo E, Quesada-Moraga E (2006): A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera, Buprestidae). *J Invertebr Pathol* 93: 210-213.
- Marannino P, Santiago-Álvarez C, de Lillo E, Quesada-Moraga E (2008): Evaluation of *Metarhizium anisopliae* Metch (Sorok.) to target larvae and adults of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in soil and fiber band applications. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 237-244.
- Marannino P, Santiago-Alvarez C, De Lillo E, Tarasco E, Triggiani O, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E (2008): Biocontrol of *Capnodis Tenebrionis* (L.) (Coleoptera, Buprestidae) with entomopathogenic fungi. *IOBC/wprs Bull* 31: 319-326.
- Marquez M, Iturriaga EA, Quesada-Moraga E, Santiago-Alvarez C, Monte E, Hermosa R (2006): Detection of potentially valuable polymorphisms in four group I intron insertion sites at the 3'-end of the LSU rDNA genes in biological control isolates of *Metarhizium anisopliae*. *BMC Microbiol* 6: 77.
- Mazet I, Vey A (1995): Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiol* 141: 1343-1348.
- Ortiz-Urquiza A, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E (2009): Purification and characterization of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science* (DOI 10.1002/ps.1803).
- Quesada-Moraga E (2002): Los hongos entomopatógenos en el control de plagas de insectos. *Phytoma* 144: 41-47.
- Quesada-Moraga E, Carrasco-Díaz JA, Santiago-Alvarez

- C (2006a): Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J Applied Entomol* 130: 442-452.
- Quesada-Moraga E, Landa BB, Muñoz-Ledesma J, Jimenez-Diaz RM, Santiago-Alvarez C (2006b): Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathol* 161: 323-329.
- Quesada-Moraga E, Maranhao EAA, Valverde-Garcia P, Santiago-Alvarez C (2006c): Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biol Control* 36: 274-287.
- Quesada-Moraga E, Martín-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C (2008): Autodissemination of *Metarhizium anisopliae* between adults of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 47: 115-124.
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Alvarez C (2007): Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol Res* 111: 947-966.
- Quesada-Moraga E, Ruiz-García A, Santiago-Alvarez C (2006d): Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). *J Economic Entomol* 99: 1955-1966.
- Quesada-Moraga E, Santiago-Álvarez C (2008): Hongos entomopatógenos. En Urbaneja A, Jacas J (eds.): "Control Biológico de Plagas", pp 98-120. Phytoma España (Valencia).
- Quesada-Moraga E, Santos-Quiros R, Valverde-García P, Santiago-Alvarez C (2004): Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea, Blattellidae). *J Invertebr Pathol* 87: 51-58.
- Quesada-Moraga E, Vey A (2003): Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Sci Technol* 13: 323-340.
- Quesada-Moraga E, Vey A (2004): Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res* 108: 441-452.
- Quesada-Moraga E, Muñoz-Ledesma FJ, Santiago-Álvarez C (2009): Systemic protection of the opium poppy, *Papaver somniferum* L., against *Iraella luteipes* (Hymenoptera; Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota; Hypocrales). *Environmental Entomology* 38:723-730.
- Roberts DW (1981): Toxins of entomopathogenic fungi. En: Burges HD (ed): "Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980". Academic Press (London): 441-464.
- Santiago-Alvarez C (1991): The knowledge of fungal entomopathogens in Spain. *IOBC wprs Bull XIV/7*: 85-89.
- Santiago-Alvarez C, Maranhao EA, Maranhao E, Quesada-Moraga E (2006): Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. *Biocontrol* 51: 519-532.
- Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E (2008): Control de langostas y saltamontes. En Urbaneja A, Jacas J (eds.): "Control Biológico de Plagas", pp 191-217. Phytoma España (Valencia).
- Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E, Araujo E, Valverde-García P, Roman F, Chaves M, Rodríguez A (2002): Desarrollo de un formulado comercial a base de *Beauveria bassiana* para el control de insectos de interés agrícola. *Phytoma* 144:178-179.
- Vey A (1998): Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and sustainable agriculture. *IOBC Bull* 21: 71-76.
- Vey A, Hoagland RE, Butt TM (2001): Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds): "Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential". CABI Publishing (Wallingford): 311-346.
- Viaud M, Couteaudier Y, Levis C, Riba G (1996): Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint. *Fungal Genet Biol* 20: 175-183.