

DOI: <https://doi.org/10.61308/HSJZ9856>

Биологична активност на 20 изолата на ентомопатогенни гъби от род *Beauveria*

Мариана Петкова¹, Величка Спасова-Апостолова^{2*}

¹Аграрен университет - Пловдив, Катедра Микробиология и екологични биотехнологии, Пловдив, България

²Селскостопанска Академия, Институт по тютюна и тютюневите изделия, Марково, България
E-mail*: vilispasova-apostolova@abv.bg

Резюме

Ензими като хитиназа, протеиназа и липаза участват в разграждането на кутикулата на насекомите. От отделянето на тези ензими от различни микроорганизми зависи до голяма степен тяхната патогенност, вирулентност и специфичност. По този начин, нивото на ензимна активност може да представлява диагностичен инструмент за избор на ефективен агент за биологичен контрол. В настоящето изследване се използваха 20 различни изолата на ентомопатогенни гъби от род *Beauveria* и се определи тяхната липолитична, хитинолитична и протеолитична активност. Ензимните активности се оценяват качествено според наличието на зона на просветляване вследствие на тяхното разграждащо действие и количествено се изразява като съотношение между зоната на ензимна активност и диаметъра на колонията. Проведен е и PCR анализ с ген-специфични праймери локализиращи в секвенцията на *Beauveria bassiana* хитиназа - chitinase (*chit1*) ген (ACC AY145440). При по-голямата част от изследваните изолати на род *Beauveria* се установяват амплификации на фрагменти с очаквана дължина 1225 bp. Изследваните изолати от род *Beauveria* се различават по своите липолитични, протеолитични и хитин-разграждащи способности. Най-висока обща активност се установява при четири от тях 336, 340, 487 и 501 и може да бъде свързана с тяхната вирулентност. Информацията за ензимните активности на проучените изолати ще бъде необходима за разработването на ефикасен препарат за биологичен контрол на неприятелите.

Ключови думи: *Beauveria*; ензимната активност; биологичен контрол

Biological activities of 20 isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria*

Mariana Petkova¹, Velichka Spasova-Apostolova^{2*}

¹Agricultural University of Plovdiv, Department of Microbiology and Environmental Biotechnology, Plovdiv, Bulgaria

²Agricultural Academy, Tobacco and Tobacco Products Institute, Markovo, Bulgaria

Corresponding author*: vilispasova-apostolova@abv.bg

Citation: Petkova, M., & Spasova-Apostolova, V. (2024). Biological activities of 20 isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria*. *Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 58(1), 27-38 (Bg).

Abstract

Enzymes such as chitinase, proteinase and lipase are involved in the breakdown of insect cuticles. Their pathogenicity, virulence and specificity largely depend on the secretion of these enzymes by different microorganisms. Thus, the level of enzyme activity may also represent a diagnostic tool for selecting an effective biological control agent. In the present study, 20 different isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* were used and their lipolytic, chitinolytic and proteolytic activities were determined. Enzyme activities are assessed qualitatively according to the presence of a zone of lightening due to their degrading action and quantitatively expressed as a ratio between the zone of enzyme activity and the diameter of the colony. PCR analysis with gene-specific primers located in the sequence of the *Beauveria bassiana* chitinase - chitinase (*chit1*) gene (ACC AY145440) was also carried out. Amplifications of fragments with an expected length of 1225 bp were detected in the majority of *Beauveria* isolates studied. The studied isolates of the genus *Beauveria* differ in their lipolytic, proteolytic and chitin-degrading abilities. The highest total activity was found in four of them 336, 340, 487 and 501 and could be related to their virulence. The information on the enzymatic activities of the studied isolates will be necessary for the development of an efficient preparation for the biological control of the enemies.

Key words: *Beauveria*; enzyme activity; biological control

Въведение

През последните години се увеличава интереса към използване на уникалните метаболитни свойства на някои микроорганизми в областта на растителната защита с цел редуциране употребата на химични препарати и подпомагане създаването на екологично чиста продукция

(Fang et al., 2009).

Повечето почвени гъби се считат за разлагачи органична материя и допринасящи за кръговрата на хранителните вещества (Sahab, 2012). Ентомопатогенните гъби от род *Beauveria* се използват с цел растителна защита (Fang et al., 2005). Механизмите на потискане на болестите по растенията от представителите на род *Beau-*

veria sp. включват антибиоза, микопаразитизъм, конкуренция, ендифитизъм, индуцирана системна резистентност, производството на широк спектър от летливи органични съединения, хидролитични ензими (хитинази, амилази, липази, целулази, казеинази и протеази) и различни вторични метаболити (боверицин, бацинолид, боволид, боувиролоид, ооспорин, бацианин, тенелин, циклоспорин А и оксалова киселина) с антибактериални, антимикотични, цитотоксични и инсектицидни способности (Deba, et al., 2017).

Доказано е негативно влияние на *B. bassiana* върху популациите на *Dichroplus maculipennis* при царевица, *Planococcus ficus* при лозите, *Tuta absoluta* и тютюневия акар *Tetranychus evansi* при домати (Allegrucci et al., 2017, Rondot et al., 2018, Pelizza et al., 2017a, Wekesa et al., 2005). Представители на род *Beauveria* са ефективни и срещу ларвите на *Pteroma pendula*, *Anoplophora glabripennis*, *Dendrolimus tabulaeformis* и възрастните на *Ceratitis capitata* и *Bactrocera oleae* (Tajuddin et al., 2010, Goble et al., 2014, Fan et al., 2013, Konstantopoulou & Mazomenos, 2005). Освен в борбата с различни неприятели по растенията е доказана и положителна роля на четири щама *B. bassiana* срещу *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) при тикви (Jaber et al., 2014).

Има данни за възможностите на представителите от род *Beauveria* освен насекоми да подтискат и заболявания причинени от фитопатогенните гъби. В предходни изследвания се съобщава за потискане на болести, причинени от различни фитопатогени гъби (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis*, *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Thielaviopsis bassicola*, *Botrytis cinerea*, *Septoria nodorum*, *Phoma betae* и *Colletotrichum falcatum*), чрез лизиране или инхибиране растежа на мицела и покълването на спорите (Deba, et al., 2017).

Всички тези факти показват ключовото място на представителите от род *Beauveria* в съвременната растителна защита и биологично земеделие. Това налага по-пълно изследване на тяхната ензимна активност и идентификация.

Целта на настоящето проучване е изследване

на липолитична, протеолитична и хитин-разграждаща активност на 20 различни изолата от ентомопатогенни гъби от род *Beauveria*.

Материали и методи

1. Култивиране на изолатите от ентомопатогенни гъби от род *Beauveria*

Опитите са проведени през 2021-2022 при лабораторни условия в катедра Микробиология и Ентомология, при АУ-Пловдив.

Щамовете от род *Beauveria* са култивирани по метода на повърхностното посяване върху Yeast Mold agar (Oxoid, UK) и PDA (картофено декстрозен агар) (Himedia, Mumbai, India). Наличието на развити колонии в петрито е доказателство за присъствие на изследваната плесенова гъба.

За да се провери жизнеспособността на спорите, конидиален разтвор се накапва в петрита с картофено декстрозен агар. Петритата се инкубират за един ден при стайна температура и се поставят под микроскоп с цел да се определи броя на жизнените спори. Процентът на жизнеспособност бе изчислен посредством следната формула:

(Общ брой спори – общ брой на нежизнените спори) / общ брой на спорите × 100 = процента на жизненост

В изследването са включени 20 изолата от род *Beauveria* spp. (262, 270, 287, 336, 340, 426-8, 487, 495, 501, 561-re, 592, 593, 623, 626, 629, 640, 648, 717, 743, 759) предоставени от проф. д-р Славмира Драганова от Института по почвознание, агротехнологии и защита на растенията “Никола Пушкаров” (таблица 1).

2. Изследване на липолитична, протеолитична и хитинолитична активност

2.1 Изследване на липолитична активност
Липолитичната активност е изследвана, чрез метода на дифузия в агар. Като субстрат на ензимно-катализираната хидролиза се използва маслиново масло, емулгирано във фосфатен буфер (Natelson, 1980). Резултатите се отчитат като зони с промяна на цвета към червено в

резултат на усвояването на триглицеридите.

2.2. Изследване на протеолитична активност

Протеолитична активност се изследва, чрез метода на дифузия в картофено декстрозен агар (КДА), съдържащ обезмаслено мляко. Резултатите се отчитат като зони на просветляване в резултат на усвояването на казеина.

2.3. Изследване на хитинолитичната (хитиназна, хитин-разграждаща) активност

Хитинолитичната активност се изследва, чрез култивиране на изолатите на твърда хранителна среда, съдържаща колоиден хитин като източник на въглерод. Резултатите се отчитат като зони на просветляване.

3. Молекулярни изследвания

3.1. Изолване на ДНК

Изолването на ДНК е извършено чрез HiPurA™ Fungal Genomic DNA Purification Kit (Canvac, Spain) следвайки протокола от производителя. Концентрациите на изолираните ДНК проби са определяни на агарозен гел, чрез сравняване със стандартни концентрации на ламбда ДНК (Thermo Scientific). От 300 ng/μL ламбда ДНК-разтвор са приготвени четири концентрации: I - 50 ng/μL, II - 20 ng/μL, III - 10 ng/μL и IV - 5 ng/μL, които да послужат за сравняване на концентрациите на изолираните ДНК-проби.

3.2. Изследване на ген *Bbchit 1* кодиращ хитиназа при *B. bassiana*

Реакциите на амплифициране са проведени в общ обем 10 μL. За провеждане на PCR реакциите са използвани готови PCR миксове Red-Taq ДНК полимеразата (Canvac). Използвана е ДНК матрица в количества от 30 - 50 ng. Проведени са PCR реакции с два праймера *Bbchit1-1* (5'-CCCTTCTACCCTTGACTTGTTTC-3') и *Bbchit1-2* (5'-ATCTACAАААТATGTACCAAC-3') конструирани от Fang et al., (2005) с лека модификация на *Bbchit1-2* праймера. За амплифициране на фрагмент от 1225 bp е използвана PCR реакцията по Fang et al., (2005) с някои модификации. Условието на реакцията: 2 минути при 94° C, последвани от 35 цикъла от 45 s при 94° C, 45 s при 55° C за реакция с праймери *Bbchit1-1* и *Bbchit1-2*, 2 минути при 72° C с окончателно удължаване от 10 минути при 72° C.

PCR продуктите с големина приблизително 1225 bp са разделяни на 1% агарозен гел оцветен с SafeView (NBS Biologicals, UK) при 100 V в продължение на 50 минути, като се използва VWR Mini Electrophoresis System за гел визуализация. GeneRuler 1 kb плус (Biooneer, Ю. Корея) се използва като молекулен маркер.

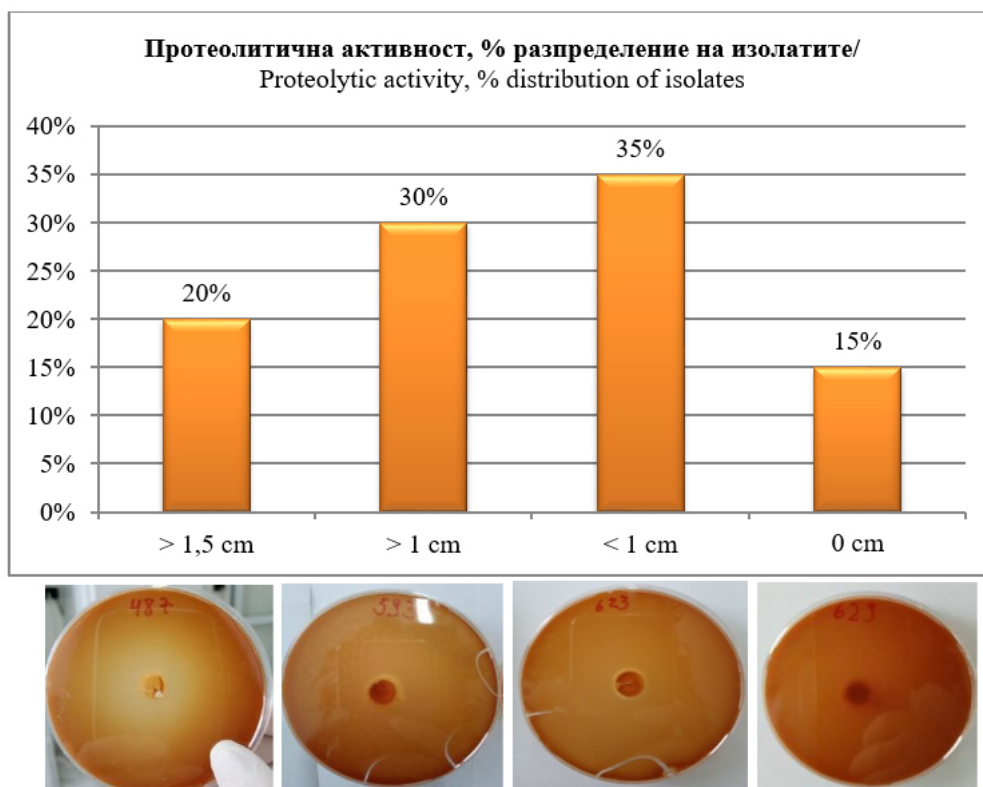
Резултати и дискусия

Ентомопатогенността на гъби, като *Beauveria* е свързана предимно с ензимите за разграждане на кутикулата на насекомите, която е със силно хетерогенна структура съставена от восък, протеин, хитин, свързан с липидни и фенолни съединения, представляващи значителна бариера за разграждащите способности на плесенните гъби. За това синтеза на протеинази, хитиназа и липази са важни за ентомопатогенността. Установяването на корелация между производството на тези ензими и вирулентността, и разбирането на техния механизъм на действие би могъл да бъде полезен за създаването на по-ефективни и по-безопасни екологични микроинсектициди (Petrisor & Stoina, 2017).

Степента, в която протеолитичната дейност допринася за проникване на *Beauveria bassiana* в насекомите все още не е напълно уточнена, тъй като предварителна обработка на кутикулата на насекомите с протеаза значително подобрява хидролизата чрез хитиназа, което показва че хитина е обвит от протеин. Въпреки това при мутанти с изменено протеазно производство не се отчита промяна във вирулентността срещу ларви на комари (Robert & Messing-Al-Aidroos, 1985, Bidochka & Khachatourians, 1987).

Изследваните 20 изолата от род *Beauveria* проявяват различни нива на протеолитична активност (фиг. 1).

Десет от изследваните изолати (287, 336, 340, 426-8, 487, 495, 501, 593, 717 и 759) проявяват висока протеолитична активност със зона над 1 cm, но най-висока активност е отчетена при изолатите 287, 426-8, 487 и 717. Слаба протеолитична активност е отчетена при седем от изследваните изолати (262, 592,



Фиг. 1. Процентно разпределение според степента на протеазна активност на 20 различни изолата на ентомопатогенни гъби от род *Beauveria*, и снимки на някои изолати, култивирани в твърда среда, съдържаща 1% обезмаслено мляко

Fig. 1. Percentage distribution according to the protease activity level of 20 different isolates of the entomopathogenic fungus of the genus *Beauveria*, fungal isolates cultivated in solid medium containing 1% skimmed milk with pictures of some isolates cultivated in skim milk agar

Таблица 1. Изолати на ентомопатогенни гъби от род *Beauveria* използвани в експериментите

Table 1. Isolate entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* used in the experiments

Изолат/ Isolate	Гостоприемник/ Host
262, 270, 287, 495, 640	Житен бегач (<i>Zabrus tenebrioides</i>)
336, 340, 487	Житна пиявица (<i>Lema melanopus</i> L.) и синя житна пиявица (<i>Lema lichenis</i> Voet)
426-8	Скакалци (<i>Acrida cinerea</i>)
501, 592, 593, 626, 648	Ябълков плодов червей (<i>Cydia pomonella</i>) Сливов плодов червей (<i>Cydia funebrana</i>)
717, 743, 759, 561-re	Колорадски бръмбар (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) ларва/ larva, възрастно/adult
623, 629	Оранжевийна белокрилка (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)

623, 626, 640, 648 и 743). При три от изолатите 270, 561-ге и 629 не е отчетена протеолитична активност с избраните експериментални условия (фиг. 1).

В изследвания на Hussein et al., (2012) за производство на протеази и липази от 90 изолата на *Beauveria bassiana* и 15 изолата на *Metarhizium anisopliae* също са установени значителни вариации в ензимното действие на изолатите. Hussein et al., (2012) доказват също, че високите ензимни активности *in vitro* не показват непременно висока вирулентност срещу тествания вредител.

В различни изследвания е установено, че проявата на ензимната активност варира не само между различните изолати, но и в зависимост от условията на култивиране - температурата (Pelizza et al., 2017), различните дни в които са отчитани (т.е. възрастта на културата) (Dhawan & Joshi 2017) и от използваната хранителната среда (Dhar & Kaur, 2010). В други изследвания се съобщава за зависимост на проявените от изолатите ензимни активности от температурата. Някои изолати, култивирани при 4° C проявяват липолитична активност, а при култивирането им на 15° C и 26° C не е отчетена активност. Други изолати при 4° C и 15° C не са проявили хитинолитична активност, а е отчитана при 26° C (Pelizza et al., 2017).

Липолитичните ензими също участват в епикуткуларната липидна хидролиза и по този начин улесняват проникването на гъбите през най-външната кутикуларна бариера на насекомото (Wang et al., 2020). Липазите са отговорни за хидролизата на естерните връзки на липопротеини, мазнини и восъци (Petrisor & Stoina, 2017). Освен важната роля в процеса на патогенезата при насекоми, извънклетъчните липази от *Beauveria bassiana* щам CG481 са от голямо значение и в различни биотехнологични и фармацевтични производства. Липазите от *Beauveria* имат предимство, като безвредни за човека, за това имобилизирането им върху силикагел са важни за науката и биотехнологиите (Sugahara & Varéa., 2014).

Изследваните 20 изолата проявяват голяма вариация по отношение на липолитичната

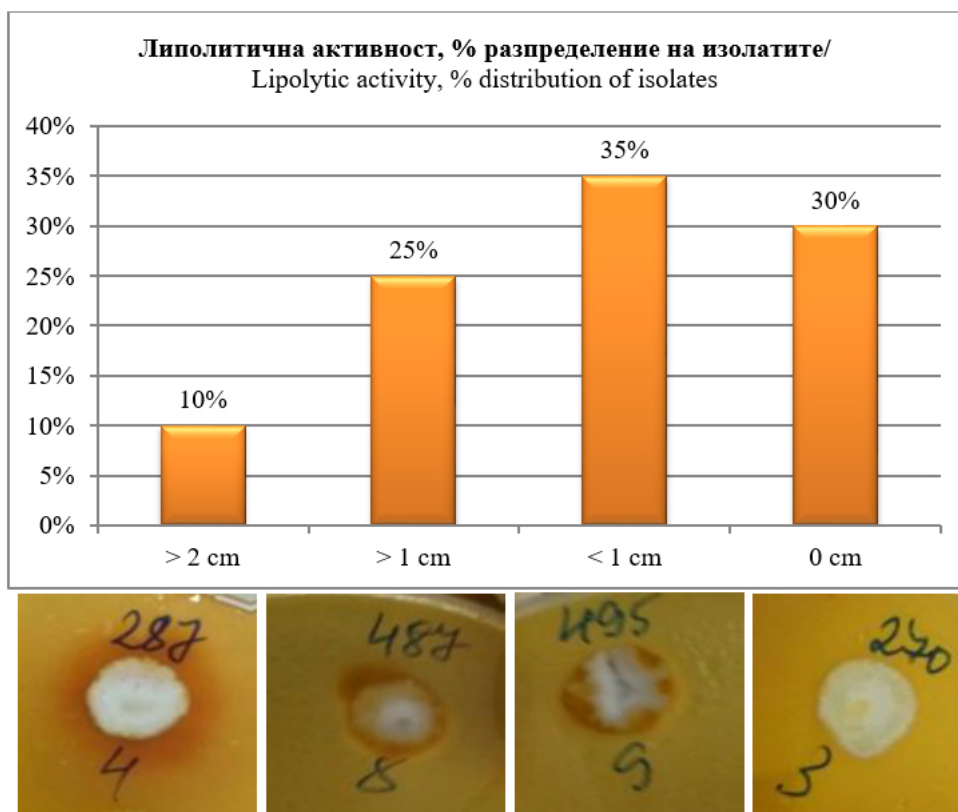
активност (фиг. 2). Отчетени са различни нива на липолитична активност дори и при едни и същи изолати при отчитане на резултатите в различни дни и при тестване по два различни начина, чрез кладенчета и чрез директно нанасяне.

Наличието на хитин в кутикулата на насекомите и в клетъчните стени на фитопатогенните гъби предполага, че хитинолитичната активност на представителите от род *Beauveria* е важна за ентомопатогенната и антимикотичната активност.

Изследваните 20 изолата показват сравнително висока хитинолитична активност. Само при 2 от изолатите в избраните експериментални условия не е отчетена хитинолитична активност. От изследваните 20 изолати от род *Beauveria* най-висок процент (40%) проявяват висока хитинолитична активност. Около 50% от тях проявяват различни средни и слаби нива на хитинолитична активност, а само при 10% от тях не се установява хитинолитична активност (фиг. 3).

В различни изследвания е доказано, че хитинолитичната активност зависи от хранителната среда. При изследване на хитиназната активност в четири различни хранителни среди е установено, че висока ензимна активност се наблюдава в средата с колоиден хитин, като единствен източник на въглерод, и рязко намалява, при наличието на лесно достъпни източници на въглерод. Доказано е, че използването на среда с азотен източник от пептон и екстракт от дрожди също има положителен ефект върху хитиназната активност (Dhar & Kaur, 2010). В друго изследване от 1998 се съобщава, че наличието на дрождев екстракт намалява добива на хитиназа (Suresh & Chandrasekaran, 1998). В настоящето изследване също е използван колоиден хитин, като източник на въглерод.

Инфекцията от ентомопатогенни гъби е многоетапен процес от адхезия на гъбни спори върху кутикулата на насекомите и проникването на инвазивна хифи в гостоприемника. Протеинази, хитинази и липази са важни за ентомопатогенността и за разграждането на кутикулата на насекомите (Vega et al., 2012).



Фиг. 2. Процентно разпределение според степента на липолитична активност на 20 различни изолати от ентомопатогенни гъби от род *Beauveria*, и снимки на избрани изолати с висока, ниска и липсваща култивирани в твърда среда, съдържаща маслиново масло, емулгирано във фосфатен буфер

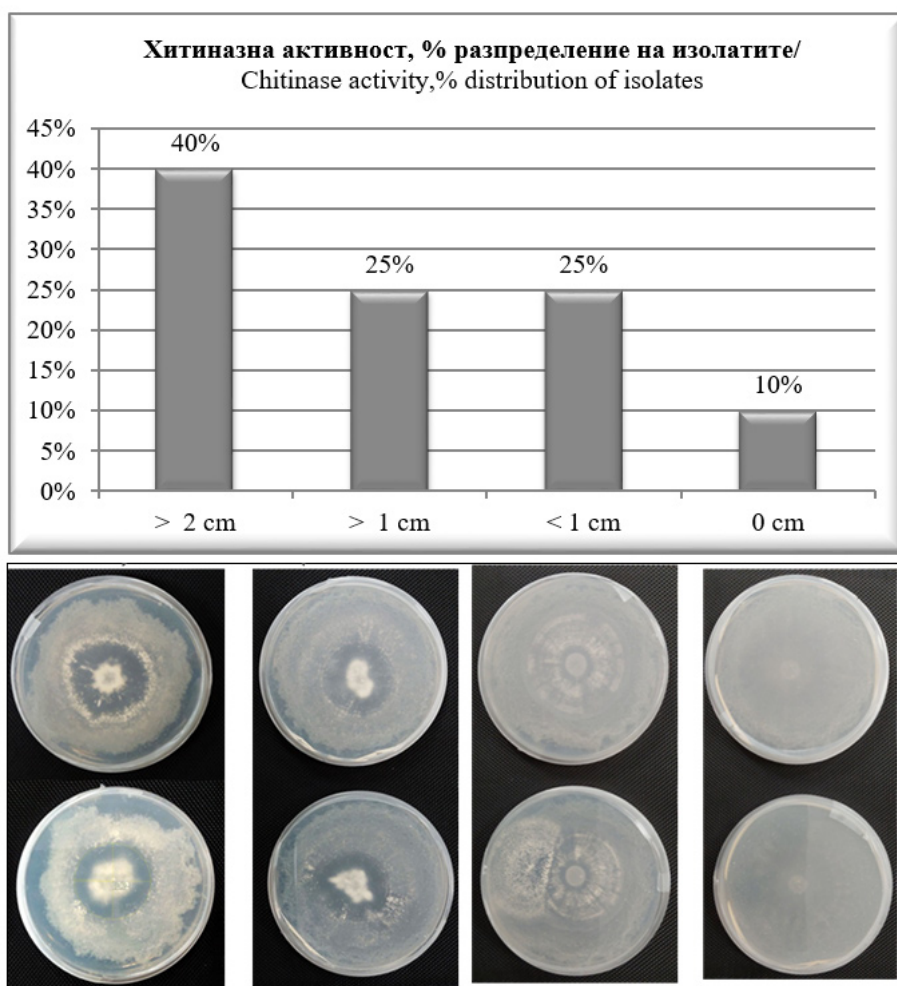
Fig. 2. Percentage distribution according to the level of lipolytic activity of 20 different isolates of the entomopathogenic fungus of the genus *Beauveria* and photographs of selected high, low and limpid isolates cultivated in solid medium containing olive oil emulsified in phosphate buffer

От генома на *B. bassiana* са клонирани и характеризирани два хитиназни гена *Bbchit1* и *Bbchit2*, но нито един не притежава домейни, свързващи хитин (Fan et al., 2007). На ниво аминокиселини, *Bbchit1* е показала значително сходство с предполагаема ендохитиназа на *Streptomyces avermitilis*, предполагаема хитиназа на *Streptomyces coelicolor* и ендохитиназа на *Trichoderma harzianum Chit36Y*. Въпреки това, *Bbchit1* има много ниски нива на идентичност с други хитиназни гени, изолирани преди това от ентомопатогенни гъби, което показва, че *Bbchit1* е нов хитиназен ген. Участието на хитиназа в патогенезата на гъбичките от насекоми не е напълно характеризирано (Fang et al., 2005). Биоанализът на насекомите разкрива,

че свръхпроизводството на *Bbchit1* повишава вирулентността (Jia et al., 2010).

В проучване от 2010 хитиназния ген (*Bbchit1*) от *Beauveria bassiana* е въведен в китайска бяла топола (*Populus tomentosa* Carr.) чрез трансформация медирана от *Agrobacterium tumefaciens*. RT-PCR анализът е показал, че гена *Bbchit1* се транскрибира в трансформирани растения и свръхекспресията му води до устойчиви на заболяването бактериален рак, причинено от *Cytospora chrysosperma* в трансформирани тополови растения (Jia et al., 2010).

В настоящето проучване са използвани праймери позиционирани в секвенцията на *Beauveria bassiana* хитиназа, chitinase (*chit1*) ген gene (Acc. AY145440) (Fang et al., 2005).



Фиг. 3. Процентно разпределение според степента на хитиназна активност на 20 различни изолати от ентомопатогенни гъби от род *Beauveria* и снимки на избрани изолати, култивирани в твърда среда, съдържаща колоиден хитин.

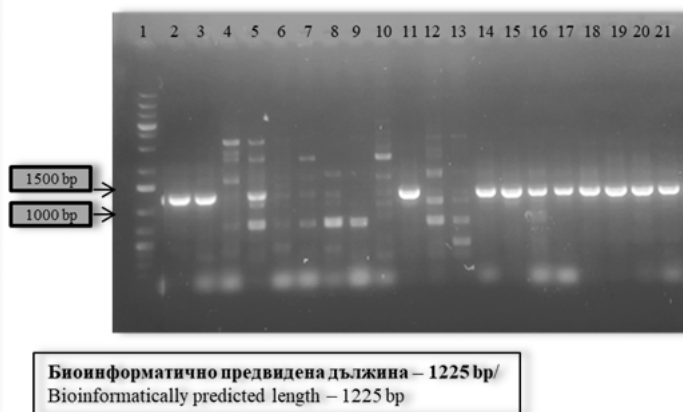
Fig. 3. Percentage distribution according to the chitinase activity level of 20 different isolates of the entomopathogenic fungus of the genus *Beauveria* and photographs of selected isolates, cultivated in solid medium containing colloidal chitin

Единичен и интензивен фрагмент с очаквана дължина 1225 bp е амплифициран при 11 от изследваните изолати (262, 270, 561-re, 623, 626, 629, 640, 648, 717, 743 и 759). При шест от изолатите (336, 340, 426-8, 487, 501 и 593) има амплифициран фрагмент на 1225 bp, но с ниска интензивност би могло да е резултат на неспецифична амплификация. При тях се установява също и допълнителна амплификация на фрагменти (фиг. 4).

Тъй като изследваните изолати са от род

Beauveria, но базирайки се на резултатите от морфологичните и физиологични изследвания не всички са *Beauveria bassiana*. Единичен и интензивен фрагмент с очаквана дължина е амплифициран само при представители на *Beauveria bassiana*. При останалите представители от род *Beauveria* е отчетен като резултат, където се установява амплификация на фрагмент с очаквана дължина независимо от слаба интензивност, но са необходими допълнителни изследвания на секвенционно ниво, за да се

Номер/ Number	Изолат/ Isolates	Резултати/ Results
1	Ladder	0
2	262	+
3	270	+
4	287	-
5	336	+
6	340	+
7	426-8	+
8	487	+
9	495	-
10	501	+
11	561-re	+
12	592	-
13	593	+
14	623	+
15	626	+
16	629	+
17	640	+
18	648	+
19	717	+
20	743	+
21	759	+



Фиг. 4. PCR анализи с праймери локализирани в *Beauveria bassiana chitinase (chit1)* gene, complete cds. (Acc: AY145440)

Fig. 4. PCR analyzes with primers located in the *Beauveria bassiana chitinase (chit1)* gene, complete cds. (Acc: AY145440)

установи дали е в резултат на неспецифична амплификация.

Изследваните 20 изолата проявяват доста различни нива на протеолитична, липолитична и хитинолитична активност. Най-висока обща активност се установява при 4 от тях (336, 340, 487 и 501) и в по-ниска степен при изолати 287, 426-8, 640, 648, 717, 743 и 759 (таблица 2).

В някои изследвания се посочва, че нивата на специфични ензими за разграждане на кутикула като протеази, са свързани положително със специфични параметри на вирулентността, в други проучвания се доказват, че много фактори се намесват директно в процеса и са необходими повече изследвания за разбиране на този комплексен механизъм.

Таблица 2. Протеолитична, липолитична и хитинолитична активност на 20 изолата от *Beauveria* spp.

Table 2. Proteolytic, lipolytic and chitinolytic activity of 20 isolates from *Beauveria* spp.

Изолати/ Isolates	Протеолитична активност/ Proteolytic activity	Липолитична активност/ Lipolytic activity	Хитиназна активност/ Chitinase activity
262	+	–	+++
270	–	–	++
287	+++	+++	+
336	++	++	+++
340	++	+++	++
426-8	+++	+	+
487	+++	++	+++
495	++	+	–
501	++	++	++
561-re	–	+	++
592	+	+	–
593	++	–	+
623	+	–	+++
626	+	–	+++
629	–	++	+++
640	+	++	+++
648	+	–	+++
717	+++	+	+
743	+	+	++
759	++	+	+

Зона на просветляване/

Zone of lightening

+++ - протеолитична активност - зона > 1,5 cm./

+++ - proteolytic activity- zone > 1,5 cm./

+++ - липолитична и хитиназна активност- зона > 2 cm/

+++ - lipolytic and chitinase activities - zone > 2 cm

++ - активности - зона > 1 cm/

++ - activities - zone > 1 cm

+ - активности - зона < 1 cm/

+ - activities – zone < 1 cm

0 - липсва зона/

0 - missing zone

Изводи

В избраните експериментални условия изследваните 20 изолата проявяват доста различни нива на протеолитична, липолитична и хитинолитична активност, като изолати 336, 340, 487 и 501 проявяват сравнително висока обща активност. Те имат висок потенциал да бъдат използвани като агент за биоконтрол на неприятелите по селскостопанските култури. Тези резултати дават основание да бъдат проведени експерименти и при полски условия.

Благодарности

Изказваме специални благодарности на проф. д-р Славмира Драганова от Селскостопанска академия – България, Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията (ИПАЗР) „Н. Пушкиarov“ за предоставяне на изолатите от род *Beauveria*.

Литература

Allegrucci, N., Velazquez, M. S., Russo, M. L., Pérez, M. E., & Scorsetti, A. C. (2017). *Endophytic colonisation of tomato by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana: the use of different inoculation techniques and their effects on the tomato leafminer Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*.

Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1987). Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1679-1684.

Deba, L., Rajesha, T., Tombisanaa, R. K., & Majumdera, D. (2017). Antagonistic potential of *Beauveria* sp. against phytopathogens. *Bull Environ Pharmacol Life Sci*, 6(3), 207-212.

Dhar, P. & Kaur, G. (2010). Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Biotechnology*, 9 (47), 8092-8099.

Dhawan, M., & Joshi, N. (2017). Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Brazilian journal of microbiology*, 48(3), 522-529.

Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M.J & Pei, Y. (2007). Increased Insect Virulence in *Beauveria bassiana* Strains Overexpressing an Engineered Chitinase. *Appl Environ Microbiol.*, 73(1), 295–302.

Fan, J., Xie, Y., Xue, J., & Liu, R. (2013). The effect of

Beauveria brongniartii and its secondary me-tabolites on the detoxification enzymes of the pine caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis*. *Journal of Insect Science*, 13(1), 44.

Fang, W., Feng, J., Fan, Y., Zhang, Y., Bidochka, M. J., Leger, R. J. S., & Pei, Y. (2009). Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 155-159.

Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. & Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application to Improve Fungal Strain Virulence. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 363–370

Goble, T. A., Rehner, S. A., Long, S. J., Gardescu, S., & Hajek, A. E. (2014). Comparing virulence of North American *Beauveria brongniartii* and commercial pathogenic fungi against Asian longhorned beetles. *Biological control*, 72, 91-97.

Hussein, K.A., Abdel-Rahman, M.A.A., Abdel-Mallek, A.Y., El-Maragy, S.S. & Joo, H.J. (2012). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. *Phytoparasitica*, 40, 117–126.

Jaber, L. R., & Salem, N. M. (2014). Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. *Biocontrol science and technology*, 24(10), 1096-1109.

Jia, Z., Sun, Y., Yuan, L., Tian, Q., & Luo, K. (2010). The chitinase gene (*Bbchit1*) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytospora chrysosperma* in *Populus tomentosa* Carr. *Biotechnology letters*, 32, 1325-1332.

Konstantopoulou, M. A., & Mazomenos, B. E. (2005). Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata*. *BioControl*, 50(2), 293-305.

Natelson, S., Natelson, E. A., Natelson, S., & Natelson, E. A. (1980). Transferrin: Iron Metabolism. *Principles of Applied Clinical Chemistry: Chemical Background and Medical Applications. Volume 3: Plasma Proteins in Nutrition and Transport*, 287-328.

Pelizza, S.A, Mariottini, Y, Russo L.M., Vianna, M.F., Scorsetti, A.C., & Lange, C.E. (2017a). *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) Introduced as an Endophyte in Corn Plants and Its Effects on Consumption, Reproductive Capacity, and Food Preference of *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *J Insect Sci*, 17(2), 53. doi: 10.1093/jisesa/iex024. PMID: 28423416; PMCID: PMC5416762.

Pelizza, A.S., Medina, E.H., Ferreri, A.N., Eliades, A.L., Pocco, E.M., Stenglein, S. and Lange, E.C. (2017). Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of King Saud University – Science*, 32 (1). DOI: 10.1016/j.jksus.2017.11.006.

Petrisor, C., & Stoian, G. (2017). The role of hydrolytic enzymes produced by entomopathogenic fungi in pathogenesis of insects mini review. *Romanian J Plant Prot*, 10, 66-72.

Robert, A., & K. Messing-Al-Aidroos. (1985). Acid production by *Metarhizium anisopliae*: effects on virulence against mosquito and on detection of in vitro amylase, protease, and lipase activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 45, 9-15.

Rondot, Y., & Reineke, A. (2018). Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*, 116, 82-89.

Sahab, A. F. (2012). Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. *J. Appl. Sci. Res*, 8(3), 1441-1444.

Sugahara, V. H., & Varéa, G. D. S. (2014). Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 842-850.

Suresh, P. V., & Chandrasekaran, M. (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 655-660.

Tajuddin, N. S. A., Ali, S. R. A., Bakeri, S. A., & Kamaruzzaman, N. E. (2010). Effect of *Beauveria brongniartii* and *B. bassiana* on oil palm bagworm, *Pteroma pendula* (Joannis). *Journal of Oil Palm Research*, 22(1), 729-735.

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. *Insect pathology*, 171-220.

Wang, Z., Pan, H., Huang, J. & Yu, X. (2020). The zinc finger transcription factors *Bbctf1 α* and *Bbctf1 β* regulate the expression of genes involved in lipid degradation and contribute to stress tolerance and virulence in a fungal insect pathogen. *Pest Manag Sci.*, 76(8), 2589-2600.

Wekesa, V. W., Maniania, N. K., Knapp, M., & Boga, H. I. (2005). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental & applied acarology*, 36, 41-50.

Received: 15th November 2023, **Approved:** 8th February 2024, **Published:** March 2024