



UNIVERSIDAD  
DE  
CÓRDOBA



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Control de *Labidostomis lusitanica* Germar  
(Coleoptera: Chrysomelidae) con  
*Aspergillus tubingensis* y *A. flavus* en  
condiciones controladas**

---

Titulación: Máster Universitario en Protección Vegetal

Departamento de Agronomía (Unidad de Excelencia María de Maetzu)

Presentado por: **Guillermo Cañadas García**

Directores: **Inmaculada Garrido Jurado y Juan Moral Moral**

Convocatoria: **junio, 2023**

Curso académico: **2022/2023**



*A todos aquellos que me han formado parte de este trabajo.*

*A Juan, Inma, Tere y Jorge por su gran ayuda en el proyecto, así como a los directores del máster Javier y Enrique.*

*Por supuesto, también a Sara y a mi familia y amigos por el apoyo incondicional que me han ofrecido.*



## Resumen

Las especies de hongos del género *Aspergillus* muestran una gran diversidad de hábitos de vida. En su mayoría son hongos saprófitos de suelo, pero algunos de ellos han mostrado ser entomopatógenos. En el presente trabajo fin de máster (TFM) se ha identificado morfológica y molecularmente una cepa de la especie *Aspergillus tubingensis* Mosseray (Ascomycota: Aspergillaceae) (FIT-22014) aislada de adultos de clitra, *Labidostomis lusitanica* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae), una de las principales plagas del pistachero en España. El aislado FIT-22014 ha mostrado capacidad entomopatógena en larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). La patogenicidad de la cepa FIT-22014, ha sido comparada con la mostrada por tres cepas atoxigénicas (no productoras de aflatoxinas) de la especie *A. flavus* (ASP041, ASP040 y ASP026) seleccionadas previamente según su capacidad para reducir micotoxinas (aflatoxinas) en frutos de pistachero.

Inicialmente, la caracterización morfológica de la cepa FIT-22014 se realizó atendiendo a la morfología del conidióforo y los conidios, mientras que la caracterización molecular se abordó a través de la secuenciación de las regiones ITS, BT2 y CMD.

El ensayo de patogenicidad confirmó que las cuatro cepas son entomopatógenas, si bien todos mostraron mortalidades inferiores al 50%. La cepa ASP041 de *A. flavus* fue la que redujo más la población de *G. mellonella* al producir 28.57% de mortalidad total y un 3.33% de pupas malformadas. La cepa FIT-22014 de *A. tubingensis*, que fue la aislada de los adultos de *L. lusitanica*, presentó un 17.24% de mortalidad total, y un 3.67 y 3.33% de adultos y pupas malformadas. En este trabajo se describe por primera vez *A. tubingensis* como agente entomopatógeno. Además, cabe destacar que el empleo de cepas atoxigénicas de *A. flavus* podría utilizarse con un doble propósito, reducir el contenido de aflatoxinas en pistachos y controlar fitófagos, disminuyendo así los costes de producción dentro de una estrategia de control integrado de plagas y enfermedades.

**Palabras clave:** *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus flavus*, control integrado de plagas y enfermedades, *Galleria mellonella*, *Labidostomis lusitanica*

## Abstract

Fungal species of *Aspergillus* genus show a great diversity of lifestyles. Most of them are saprophytic soil fungi, but only few have shown entomopathogenicity. In the present master's thesis (TFM), the strain FIT-20014 of *A. tubingensis* isolated from leaf beetle adults, *Labidostomis lusitanica* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae), was indentified morphologically and molecularly. This insect is one of the main pests of pistachio trees in Spain. The FIT-22014 isolate exhibited entomopathogenic capacity against *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. The pathogenicity of the FIT-22014 strain was compared whith three atoxigenic strains (not aflatoxins producers) of *A. flavus* (ASP041, ASP040 and ASP026), that they were previously selected based on their ability to reduce the mycotoxins (aflatoxins) in pistachio nuts.

The morphological characterization of the FIT-22014 strain was carry out based on the morphology of the conidiophore and the conidia, while the molecular characterization was approached through the sequencing of the ITS, BT2 and CMD regions.

The pathogenicity assay confirmed that the four strains are entomopathogenic, although their mortalities were lower than 50%. The *A. flavus* strain ASP041 obtained the higher reduction of *G. mellonella* population 28.57% of total mortality and 3.33% of malformed pupae. The *A. tubingensis* strain FIT-22014, which was isolated from *L. lusitanica* adults, showed 17.24% of total mortality, and 3.67% and 3.33% malformed adults and pupae, respectively. In this study, *A. tubingensis* is described for the first time as an entomopathogenic fungus. Furthermore, it should be noted that the use of atoxigenic strains of *A. flavus* could have a dual purpose, reducing the content of aflatoxins in pistachios and controlling phytophagous pests, thus decreasing production costs within an integrated pest and disease control strategy.

**Key words:** *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus flavus*, *Galleria mellonella*, *Labidostomis lusitanica*, integrated pest and disease control strategy.



# ÍNDICE GENERAL

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>2.1 Organismos utilizados</b> .....   | <b>5</b>  |
| • Cepas fúngicas .....   | 5         |
| • <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera: Pyralidae).....  | 6         |
| <b>2.2 Identificación morfológica de la cepa FIT-22014</b> .....   | <b>7</b>  |
| • Características microscópicas. ....  | 7         |
| <b>2.3 Identificación molecular de la cepa FIT-22014</b> .....   | <b>7</b>  |
| • Extracción de ADN. ....  | 7         |
| • Condiciones para la amplificación por PCR, purificación del producto y secuenciación de las regiones ITS, BT2 y CMD..... | 8         |
| • Caracterización molecular y árbol filogenético. ....   | 9         |
| <b>2.4 Comprobación de la capacidad entomopatógena de <i>Aspergillus tubingensis</i> y <i>A. flavus</i></b> .....          | <b>11</b> |
| • Suspensión de esporas. ....  | 11        |
| • Inoculación mediante inmersión. ....   | 11        |
| • Análisis de datos .....  | 13        |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>3.1 Identificación morfológica de la cepa FIT-22014</b> .....   | <b>14</b> |
| • Características macroscópicas. ....  | 14        |
| • Características microscópicas. ....  | 14        |
| <b>3.2 Identificación molecular de la cepa FIT-22014</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>3.3 Evaluación de la mortalidad y tiempo medio de supervivencia de larvas de <i>G. mellonella</i></b> ..                | <b>17</b> |
| • Efectos subletales producidos por el tratamiento en larvas de <i>G. mellonella</i> .....                                 | 19        |
| <b>4. DISCUSIÓN</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>24</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Adulto macho de <i>Labidostomis lusitanica</i> (Fotografía del autor). .....  | 2  |
| <b>Figura 2.</b> A) Adulto de <i>Labidostomis lusitanica</i> con crecimiento fúngico externo. B) Conidióforo del hongo esporulado en el cuerpo del insecto. C) Micelio del hongo esporulado en el cuerpo del insecto. (Fotografía del autor) .....   | 3  |
| <b>Figura 3.</b> A) FIT-22014 B) ASP026 C) ASP040 D) ASP041. (Fotografía del autor).....   | 5  |
| <b>Figura 4.</b> Larvas de <i>Galleria mellonella</i> utilizadas en el trabajo (Fotografía del autor). .....   | 6  |
| <b>Figura 5.</b> Suspensiones de esporas de izquierda a derecha: <i>Aspergillus tubingensis</i> (cepa FIT-22014), <i>Aspergillus flavus</i> (cepas ASP041, ASP040 y ASP026) y agua-Tween20 (tratamiento control) (Fotografía del autor). .....   | 11 |
| <b>Figura 6.</b> A) Larvas de <i>Galleria mellonella</i> en un filtro metálico para infusiones. B) Inmersión de larvas en una suspensión conidial. C) Secado de larvas en papel de filtro tras la inmersión. D) Larvas repartidas en 15 placas Petri con dieta. (Fotografía del autor).....  | 12 |
| <b>Figura 7.</b> A) Larvas de <i>Galleria mellonella</i> muertas en forma de cinco corazones sobre papel de filtro húmedo. B) Material de trabajo para la desinfestación de larvas muertas. (Fotografía del autor). .....  | 13 |
| <b>Figura 8.</b> Características morfológicas de la cepa FIT-22014 de <i>Aspergillus tubingensis</i> . A) Conidio tintado con fucsina. B) Vesículas vistas sin tinción. C) Conidióforo tintado con fucsina donde se ve el estipe completo. D) Vesícula y esporas tintadas con fucsina. Se aprecia una clara diferencia entre la métula y las fiálides. (Fotografía del autor). .....   | 15 |
| <b>Figura 9.</b> Árbol filogenético reconstruido mediante el método de máxima verosimilitud, basado en las secuencias obtenidas a partir de los cebadores de ITS, $\beta$ -tubulina y calmodulina de la cepa FIT-22014 y secuencias de <i>Aspergillus section Nigri</i> de la base de datos GenBank. Un valor bajo de los nodos representa una divergencia evolutiva más reciente. La reconstrucción del árbol se realizó utilizando el software de análisis filogenético MEGA 11. Los números en los nodos indican el porcentaje de bases utilizadas por el programa, obtenido a partir de 2000 repeticiones. ....  | 16 |
| <b>Figura 10.</b> Árbol filogenético reconstruido mediante el método de máxima verosimilitud, basado en las secuencias obtenidas a partir de los cebadores de ITS, $\beta$ -tubulina y calmodulina de la cepa FIT-22014 y secuencias de <i>Aspergillus section Nigri</i> de la base de datos GenBank Las distancias entre los nodos representan el número mínimo de cambios evolutivos necesarios para explicar las diferencias observadas. La reconstrucción del árbol se realizó utilizando el software de análisis filogenético MEGA 11. Los números en los nodos indican el porcentaje de bases utilizadas por el programa, obtenido a partir de 2000 repeticiones. .... | 17 |
| <b>Figura 11.</b> Mortalidad total en porcentaje de las larvas tratadas con cada cepa y sus Tiempos Medios de Supervivencia (TMS). La mortalidad se evaluó durante 12 días. ....   | 18 |
| <b>Figura 12.</b> Larvas muertas tras 7 días en cámara húmeda: A) Control (replica 3). B) FIT-22014 (replica 1). C) ASP041 (replica 2). D) ASP040 (replica 1). E) ASP026 (replica 3). (Fotografía del autor). ....   | 18 |
| <b>Figura 13.</b> Evolución del coeficiente de supervivencia de larvas de <i>Galleria mellonella</i> tratadas con las cuatro cepas de <i>Aspergillus</i> y el control. Los datos indican media $\pm$ error estándar (EE). ....   | 19 |
| <b>Figura 14.</b> Diferencias entre un adulto de <i>Galleria mellonella</i> malformado infestado con la cepa FIT-22014 y uno sano: A) y B) Dorso del adulto malformado y del sano, respectivamente. C) y D) Torso del adulto malformado y del sano, respectivamente. (Fotografía del autor). ....  | 20 |

## ÍNDICE DE TABLAS

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cepas fúngicas evaluadas. ....  | 5  |
| <b>Tabla 2.</b> Receta de la dieta larvaria de <i>Galleria mellonella</i> . ....  | 7  |
| <b>Tabla 3.</b> Números de acceso para cada cebador de los organismos utilizados para la realización del árbol filogenético. .... | 10 |
| <b>Tabla 4.</b> Concentración (conidios/mL) de la suspensión conidial de cada cepa utilizada en las inoculaciones. ....           | 11 |
| <b>Tabla 5.</b> Homología de las secuencias estudiadas de la cepa FIT-22014. ....   | 15 |
| <b>Tabla 6.</b> Probabilidad de que haya diferencias entre el control y las diferentes cepas. ....                                | 18 |
| <b>Tabla 7.</b> Porcentajes de adultos y pupas malformados de <i>Galleria mellonella</i> (media y error estándar). ....           | 20 |



# 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

El pistachero (*Pistacia vera* L.) es un árbol caducifolio y dioico, originario del Oeste y centro de Asia. Su cultivo se ha extendido por todo el mundo debido al valor de su fruto, una drupa monosperma ovoide y alargada denominada pistacho, que puede ser dehiscente o indehiscente según esté abierta o cerrada la cáscara, y donde la parte comestible corresponde a sus dos cotiledones (Couceiro et al., 2017). Se trata de una especie anemófila cuyo período de floración es de unas dos semanas en primavera (EPPO, 2022; Gómez et al., 2022). En España, desde que se declaró ‘cultivo alternativo’ en 1986, su extensión no para de aumentar y alcanza las 55.032 hectáreas, destacando notablemente la región de Castilla-La Mancha con 44.849 ha (ESYRCE, 2021).

Debido a su reciente introducción en nuestro país, las pérdidas ocasionadas por insectos fitófagos y enfermedades (aquí usaremos el término parásitos para ambos por ser parásitos animales y microbianos) son limitadas. Ello puede deberse a que los parásitos no hayan llegado al territorio o, si están, no tengan niveles poblacionales suficientes para ocasionar un daño importante. Pero cabe esperar que, transcurrido un tiempo, las poblaciones ya presentes aumenten hasta convertirse en un serio problema. Por ello, es necesario conocer sus enemigos y saber anticiparse a futuros ataques cada vez más severos. En el territorio nacional, los fitófagos más importantes que atacan el pistachero son los hemípteros *Nezara viridula* L. (chinche verde), *Agonoscena pistaciae* Burkhardt & Lauterer, *A. targionii* Lichtenstein (ambas psilas del pistacho) y *Saissetia oleae* Bern. (cochinilla), el lepidóptero *Plodia interpunctella* Hübner (piral o tinta de la semilla), y los coleópteros *Vesperus xatarti* Duf. (castañeta) y *Labidostomis lusitanica* (Germar) (clitra o galeruca). La clitra es un fitófago de especial interés ya que cuando su población aumenta adquiere un estado gregario y puede afectar gravemente al cultivo en unos pocos días (MAPA, 2018; Gómez et al., 2022).

La especie *L. lusitanica* pertenece a la familia Chrysomelidae y se encuentra distribuida por toda la geografía peninsular. El adulto presenta el tórax y la cabeza de color negro y en naranja unos élitros con dos puntos negros, uno en cada extremo externo (Figura 1); miden de longitud entre 6 y 12 mm y tienen un marcado dimorfismo sexual, pues los machos presentan unas patas delanteras más desarrolladas que las hembras; sus huevos tienen una forma cilindro-cónica, con un color claro que se va oscureciendo con el tiempo y las larvas color crema son de unos 15 mm de longitud (Couceiro et al., 2017).

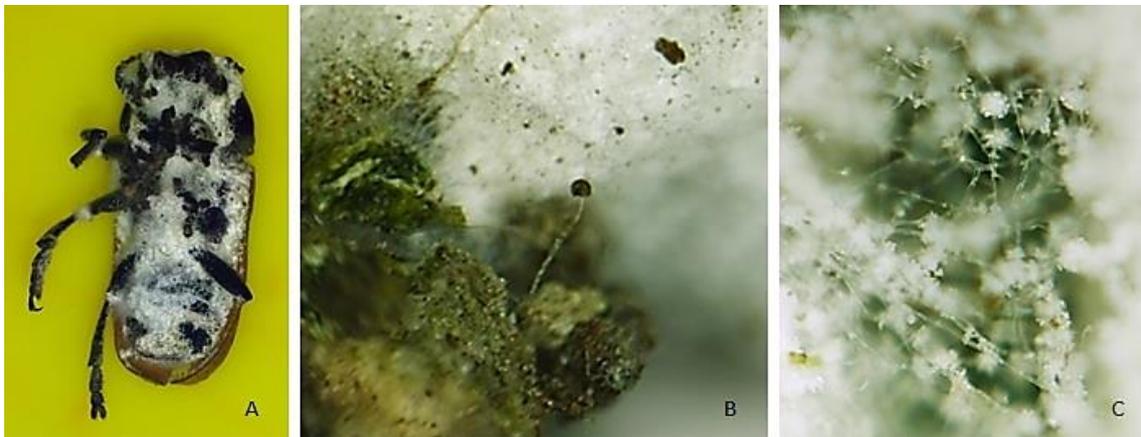
Los adultos se desplazan de las plantas adventicias a los pistacheros durante el mes de mayo, siendo éste el momento más crítico para el cultivo, debido a que empiezan a devorar las hojas jóvenes con su aparato bucal masticador. La clitra puede provocar importantes daños de defoliación en pocas horas, dejando intacto únicamente el nervio central de la hoja, produciendo el posterior debilitamiento del pistachero. En árboles jóvenes este crisomélido puede causar la muerte ya que muestra una marcada preferencia por este tipo de plantas. La cópula por acoplamiento se realiza en las hojas del árbol, aunque luego se desplazan al suelo para poner la puesta entre la maleza, en hojas y ramas, en grupos de unos 10 huevos que acabarán eclosionando tras 12 días. Después, las larvas se refugian en el suelo y hojas secas para entrar en diapausa. Si se dan las condiciones climáticas necesarias, como la ausencia de precipitaciones, podría existir incluso una segunda generación (Couceiro et al., 2017; Gómez et al., 2022).



**Figura 1.** Adulto macho de *Labidostomis lusitanica* (Fotografía del autor).

Actualmente no existen insecticidas químicos específicos para controlar la clitra (MAPA, 2022), por lo que su control recae principalmente en métodos culturales como labrar la tierra durante el invierno con intención de destruir las pupas enterradas. También es aconsejable, en los injertos del mismo año, no cortar el patrón por encima del punto de injerto para que actúe de cebo. Si el ataque no es muy severo, también se pueden sacudir las ramas y dejar que caigan en una bolsa colocada debajo. Los adultos suelen caer fácilmente con el amanecer, cuando muestran poca actividad (Couceiro et al., 2017; MAPA, 2018). Estos métodos son insuficientes para realizar un control efectivo de la clitra y urge la necesidad de alternativas de control.

Durante 2021, la Dra. Sara Rodrigo (Centro de Investigación del Chaparrillo, Castilla-La Mancha) envió un adulto de clitra muerto y que mostraba un micelio externo blanquecino al laboratorio del Dr. Juan Moral del grupo UCOLIVO del Dpto. de Agronomía de la Universidad de Córdoba (DAUCO) en el marco de una colaboración entre ambos investigadores (Figura 2). El cuerpo del insecto fue, desinfectado superficialmente, seccionado y se aisló consistentemente e identificó (únicamente atendiendo a sus características morfológicas) una especie de *Aspergillus*. En 2022, la Dra. Rodrigo identificó seis nuevos individuos de clitra con síntomas similares a los descritos y nuevamente se aislaron cepas con características morfológicas similares a la anterior.



**Figura 2.** A) Adulto de *Labidostomis lusitanica* con crecimiento fúngico externo. B) Conidióforo del hongo esporulado en el cuerpo del insecto. C) Micelio del hongo esporulado en el cuerpo del insecto. (Fotografía del autor)

En ese momento, surgieron dos hipótesis:

- 1) el hongo colonizó los insectos muertos, por lo que sería saprófito.
- 2) el hongo es el agente causal de la muerte de los insectos y, por tanto, sería el primer hongo entomopatógeno del género *Aspergillus* descrito para *L. lusitanica*.

El género *Aspergillus* está constituido por unas 180 especies que se reproducen principalmente mediante esporas asexuales (fialosporas) producidas sobre fiálides cortas. El nombre de este género se debe a que su descubridor, P.A. Micheli, comparó su característico conidióforo con un ‘aspergillum’, un dispositivo utilizado por la iglesia católica para rociar agua bendita. La base de este conidióforo presenta una estructura denominada célula pie, la cual termina en forma de ‘T’ o ‘L’. A partir de esta célula se prolonga un estipe que puede medir desde 50  $\mu\text{m}$ , o menos, hasta varios milímetros de

longitud siendo en muchas ocasiones perceptible al ojo. El apéndice del estipe se expande formando una vesícula y de ella, surgen directamente las fiálides portadoras de conidios en las especies denominadas uniseriadas. En las biseriadas, hay una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides denominada métula (Klich, 2002).

Entre las especies de *Aspergillus*, de importancia en el cultivo del pistachero, destacan aquellas pertenecientes a la Sección Flavi (principalmente, *A. flavi* y *A. parasiticus* Speare). Ambas especies causan importantes pérdidas en este cultivo debido a la contaminación de los frutos con aflatoxinas (hay una veintena de estos compuestos, pero destacan B1, B2, G1 y G2), es decir, compuestos hepatocarcinogénicos derivados del metabolismo secundario del hongo. Considerando que el pistachero es muy vecero, se calcula que son contaminados uno de 5.000 frutos de pistacho en años de descarga (off-year) y uno de 20.000 en años de carga (on-year) (Moral et al., 2020). La aflatoxina B1 es la micotoxina más tóxica y que más problemas económicos genera en la agricultura en el mundo. Una de las prácticas de control de la contaminación de aflatoxinas en precosecha más eficiente consiste en la liberación masiva de cepas atoxigénicas (no productoras de micotoxinas) de control biológico de la especie *A. flavus* que desplazan competitivamente a las cepas tóxicas nativas (García-López et al., 2022). Durante los últimos años, el Grupo UCOLIVO ha seleccionado distintas cepas atoxigénicas de *A. flavus* las cuales, además, podrían tener capacidad entomopatógena.

En este punto, cabe destacar que Reiss en 1975 determinó que la aflatoxina era tóxica para *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae).

Por otro lado, varias especies del género *Aspergillus* han mostrado ser entomopatógenas en insectos de los órdenes Orthoptera, Hemiptera, Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera (Bhan et al., 2013; Seye et al., 2014; Zhang et al., 2015; Fitriana et al., 2021; Lin et al., 2021) y ácaros (Mazid et al., 2015)

Los objetivos principales del presente Trabajo Fin de Máster es la identificación de la especie fúngica asociada a los insectos micosados naturalmente, comprobar su capacidad entomopatógena, y compararla con especies de *Aspergillus* seleccionadas como agentes de biocontrol para reducir la contaminación por aflatoxinas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Organismos utilizados

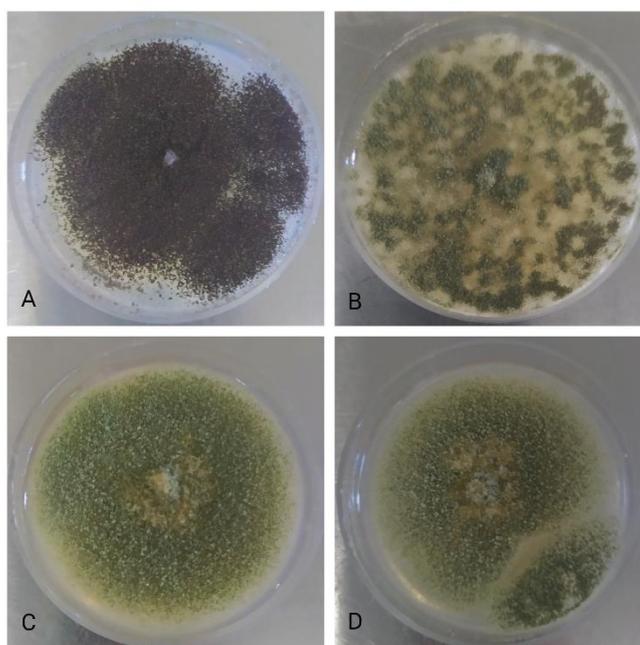
- Cepas fúngicas

Para comprobar la capacidad entomopatógena del género *Aspergillus* se utilizaron las cepas fúngicas FIT-22014, ASP041, ASP040 y ASP026 (Tabla 1; Figura 3). La primera de ellas es la cepa de *Aspergillus* sp. aislada del cuerpo de los adultos de clitra, mientras que las otras tres son *A. flavus* y proceden de la micoteca del DAUCO. Estas cepas se conservaron a través del almacenaje de micelio liofilizado a -80°C. La capacidad para producir aflatoxinas de las especies de *A. flavus* se analizó previamente mediante su reacción en Agar-Coco seguido de espectrometría de masas. Se seleccionaron cepas atoxigénicas para comprobar un potencial doble efecto: control de aflatoxinas y de clitra.

**Tabla 1.** Cepas fúngicas evaluadas.

| <b>Cepa</b> | <b>Especie</b>        | <b>Caracterización</b> |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| FIT-22014   | <i>A. tubingensis</i> | ITS-BT2-CMD*           |
| ASP041      | <i>A. flavus</i>      | ITS-BT2-CMD            |
| ASP040      | <i>A. flavus</i>      | ITS                    |
| ASP026      | <i>A. flavus</i>      | ITS-BT2-CMD            |

\*Resultados del presente TFM



**Figura 3.** A) FIT-22014 B) ASP026 C) ASP040 D) ASP041.  
(Fotografía del autor)

Las cepas se cultivaron en placas Petri de 90mm de diámetro con PDA (Agar Patata Dextrosa), bien realizando una “Z” con la aguja de siembra o a través de un par de gotas extendidas por el medio con el asa de Drigalski. Posteriormente, durante 10 días se incubaron a 30°C. Pasado dicho tiempo, con la punta del escalpelo se realizaron cultivos de puntas de hifas a medio PDA para su cultivo puro, evitando así una posible contaminación previa de las muestras madre. Pasados otros 10 días, las colonias estaban listas para hacer suspensión de esporas e inocular el insecto.

- *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Para la realización del ensayo de patogenicidad, se escogieron larvas del insecto modelo *Galleria mellonella* (Figura 4) por su gran susceptibilidad a hongos entomopatógenos (Zimmermann, 1986). Se compraron a la empresa Harkito Reptile (Madrid, España) en primer estadio larvario y se conservaron en el insectario de la Unidad de Entomología Agrícola de DAUCO hasta que alcanzaron un estadio L4 en condiciones de insectario (T = 25±2°C; HR = 70±5%). La dieta de las larvas de *G. mellonella* utilizadas en el proyecto se describe en la Tabla 2.



**Figura 4.** Larvas de *Galleria mellonella* utilizadas en el trabajo (Fotografía del autor).

Para la elaboración de la dieta se mezclaban primero los productos sólidos, luego se añadía la miel y la glicerina hasta conseguir una pasta suelta y homogénea (Tabla 2).

**Tabla 2.** Receta de la dieta larvaria de *Galleria mellonella*.

| <b>Componentes</b> | <b>Cantidades (cada 100g)</b> |
|--------------------|-------------------------------|
| Germen de trigo    | 16.40%                        |
| Levadura           | 7.50%                         |
| Leche en polvo     | 10.50%                        |
| Harina de maíz     | 16.40%                        |
| Salvado trigo fino | 16.40%                        |
| Glicerina          | 7.50%                         |
| Miel               | 25.30%                        |

## 2.2 Identificación morfológica de la cepa FIT-22014.

- Características microscópicas.

Para estudiar las características morfológicas de la cepa FIT-22014 se extrajeron los conidióforos de la zona más clara de la colonia, para que las esporas no interviniesen en la observación, con ayuda de una lanceta. Después se transfirieron a una gota de agua estéril colocada encima de un portaobjetos con la pipeta.

## 2.3 Identificación molecular de la cepa FIT-22014.

- Extracción de ADN.

Sobre una colonia pura del hongo en medio PDA se añadió 1.5 mL de agua estéril con una gota de Tween 20 para romper la hidrofobicidad de las esporas y se mezcló con un asa de Drigalski para generar una suspensión con el micelio/esporas.

Posteriormente se procedió a realizar la extracción de ADN según el protocolo para ADN fúngico de OMEGA (E.Z.N.A. ® Fungal DNA Mini Kit).

El protocolo se inició con la adición de 600  $\mu$ L FG1 Buffer y 5  $\mu$ L RNase en un tubo Eppendorf de 2 mL con 500  $\mu$ L de la suspensión de esporas de la muestra, 1 g de arena y dos esferas de 0.5 cm de diámetro. Se agitó empleando un instrumento homogeneizador FastPrep-24™ de MP Biomedicals. Se añadieron 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, se homogeneizó la mezcla en un vórtex y se incubó a 65 °C durante 5 min. Durante la incubación se invirtió el tubo de la muestra y se añadieron 140  $\mu$ L del Buffer FG2 y se mezcló de nuevo con el vórtex. Se dejó reposar en hielo 5 min. y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga, sin alterar el pellet. Se añadió medio volumen de tampón FG3 y 1

volumen de etanol 100% homogeneizando con el vórtex. La muestra, correctamente mezclada, se transfirió a la minicolumna de centrifugación de ADN HiBind® en un tubo de recolección de 2 mL. Posteriormente, se añadieron 100 µL 3M NaOH a la minicolumna y se centrifugó durante 1 min. a 10.000 rpm, el filtrado se eliminó y se reutilizó el tubo de recolección. Así se realizaron dos lavados. Después, se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y se añadieron 750 µL del tampón de lavado de ADN centrifugando a 10.000 rpm durante 1 min., eliminando el filtrado y, reutilizando el tubo de recolección para un segundo lavado del tampón de lavado de ADN. Seguidamente, se centrifugó la minicolumna de ADN HiBind vacía a máxima velocidad durante 2 min. para secar la membrana y eliminar cualquier rastro de etanol. Finalmente, se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrifugación de 2 mL sin nucleasa y se añadieron 50 µL de tampón de elución y se dejó reposar 5 min. seguido de una centrifugación durante 1 min. a 10.000 rpm para transferir el ADN al líquido de elución. La membrana se lavó nuevamente utilizando otros 50 µL de tampón de elución y se centrifugó. Las muestras de ADN total se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Una vez realizada la extracción, se midieron las concentraciones de ADN y los índices de absorbancia (A260/280 y A260/230) en un espectrofotómetro (Maestro-Nano Micro-Volume, V-Bioscience) y se ajustaron las concentraciones de ADN de cada cepa para llevar a cabo una PCR en las regiones genómicas ITS (Internal Transcriber Spacer), BT2 (βtubulina) y CMD (Calmodulina).

- Condiciones para la amplificación por PCR, purificación del producto y secuenciación de las regiones ITS, BT2 y CMD.

La concentración del ADN extraído de la cepa se ajustó a 20 ng/µl en un volumen de 100 µl, diluyendo la muestra en agua destilada, para llevar a cabo la PCR. De ahí, se empleó 1 µl de ADN en la mezcla de reacción. Se preparó la mezcla de reacción para PCR que contenía 16,87 µl de agua pura, 5 µl de buffer PCR (5x Mytaq Reaction Buffer, Bioline), 1 µl de cada pareja de cebadores (ITS1 y ITS4, BT2a y BT2b, o CMD5 y CMD6), y 0,135 µl de polimerasa (MyTaq DNA Polymerase, Bioline). En total la reacción PCR se condujo en un volumen de 25 µl. En total, se prepararon tres mezclas de reacción. La región ITS se amplificó usando el par de cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990), el segmento del gen de la β-tubulina usando los cebadores bT2a

(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') y bT2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass & Donaldson, 1995) y el segmento del gen de la calmodulina usando los cebadores CMD5 (5'- CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') y CMD6 (5'- CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3') (Hong, 2005). En un termociclador (Bio-Rad T100) las mezclas preparadas para PCR se precalentaron inicialmente a 95°C durante 4 min., después se realizaron 35 ciclos a 95°C durante 15 s, a 48°C durante 20 s, y a 72°C durante 1 min. Finalmente, el equipo mantuvo el producto PCR de las muestras a 4°C hasta que se retiró del mismo y se conservó en refrigeración para su posterior purificación. Para la purificación del producto PCR se empleó el kit de purificación MEGAquickspin™ Plus. Para ello, se transfirieron 25 µl del producto PCR a un tubo de microcentrifuga y se añadieron 5 volúmenes de BN L Buffer/Plus, y se mezcló bien con el vórtex. Se colocó una columna en un tubo colector donde se transfirió la mezcla, seguido de una centrifugación a 11.000 rpm durante 30 segundos eliminando el filtrado. Después, se agregaron 750 µl de Wash Buffer / Plus (etanol) a la columna seguido de una centrifugación a 11.000 rpm durante 30 segundos eliminando el etanol. Se centrifugó de nuevo a máxima velocidad a 18 000 rpm durante 3 min. más para secar la membrana de la columna y se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrifuga donde se añadieron 40 µl del tampón de elución / Plus o ddH<sub>2</sub>O al centro de la membrana de la columna. Se dejó reposar la columna durante 1 min. y se centrifugó de nuevo a máxima velocidad a 18 000 rpm durante 1 min. para eludir el ADN. Una vez purificado el producto PCR, se midieron las concentraciones resultantes de nuevo en espectrofotómetro. A continuación, se prepararon seis tubos de microcentrifuga (dos por par de cebadores correspondientes a cada región genómica) de cada muestra conteniendo una mezcla de 7µl con 100 ng totales de ADN y 3.2 pmol de cada cebador para llevarlas al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UCO y realizar la secuenciación con el método de Sanger.

- Caracterización molecular y árbol filogenético.

Los datos de cada secuencia fueron inspeccionados, ensamblados y optimizados usando el software MEGA (v. 11). Las secuencias 'sentido' y 'antisentido' de cada cebador fueron alineadas a través del algoritmo 'MUSCLE', presente en dicho software.

Una vez obtenidas las tres secuencias de la cepa FIT-22014, una por cada cebador, se utilizó la herramienta 'BLAST' (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro

Nacional para la Información Biotecnológica, NCBI (National Center for Biotechnology Information) para comparar nuestra secuencia con una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la base de datos de NCBI (GenBank).

BLAST emplea un algoritmo heurístico que encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema y calcula la significación de los resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen.

Para la realización del árbol filogenético se utilizó también el software MEGA (v. 11). Desde la base de datos GenBank se añadieron secuencias de: tres *A. tubingensis*, un *A. niger*, un *A. vadensis* y un *A. carbonarius*, correspondientes a las regiones utilizadas para la identificación, considerando la elevada homología con las muestras de estudios (Tabla 3). Una vez introducidas todas las secuencias, se alinearon junto con las obtenidas de la cepa FIT-22014. Posteriormente se buscó el modelo evolutivo que más se ajustara a los datos para poder construir después dos árboles filogenéticos, uno a través de la estimación por máxima verosimilitud y otro por máxima parsimonia.

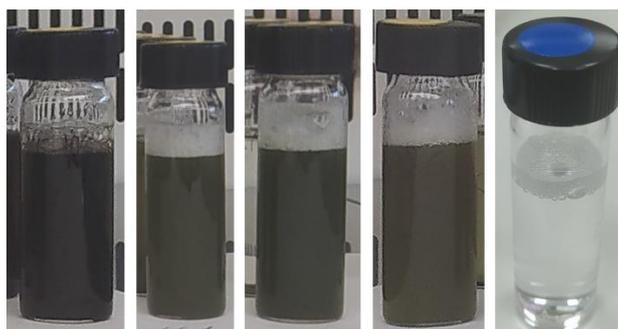
**Tabla 3.** Números de acceso para cada cebador de los organismos utilizados para la realización del árbol filogenético.

| Organismo             | Cepa       | Número de acceso |            |            |
|-----------------------|------------|------------------|------------|------------|
|                       |            | ITS              | BT2        | CMD        |
| <i>A. tubingensis</i> | NRRL 365   | EF661190.1       | EF661084.1 | EF661149.1 |
|                       | NRRL 62643 | KC796397.1       | KC796369.1 | KC796385.1 |
|                       | IHEM 1941  | MH613159.1       | MH614550.1 | MH644900.1 |
| <i>A. vadensis</i>    | IHEM 26351 | MH613142.1       | MH614547.1 | MH644878.1 |
| <i>A. niger</i>       | NRRL 326   | EF661186.1       | EF661089.1 | EF661154.1 |
| <i>A. carbonarius</i> | NRRL 346   | EF661203.1       | EF661098.1 | EF661166.1 |

## 2.4 Comprobación de la capacidad entomopatogena de *Aspergillus tubingensis* y *A. flavus*

- Suspensión de esporas.

Se preparó una suspensión de esporas por cada cepa evaluada (Figura 5). Para ello, se rellenaron 100 viales de cristal con 10 mL, con 9 mL de Tween 20 al 0,2% (2 mL/L de agua estéril). Los tubos se habían esterilizado previamente en el autoclave a 120°C durante 20 minutos. Posteriormente, con una pipeta se transfirió un 1 mL de cada tubo a colonias del hongo en placa. Después, se realizó un raspado de la colonia usando un asa de Drigalski. La suspensión de conidios del hongo se recuperó con ayuda de una pipeta y se transfirió a otro tubo con los 9 mL, siendo el volumen final 10 mL/tubo. Finalmente, se ajustó la suspensión a unas  $10^8$  esporas por mL para la inoculación del insecto (Tabla 4).



**Figura 5.** Suspensiones de esporas de izquierda a derecha: *Aspergillus tubingensis* (cepa FIT-22014), *Aspergillus flavus* (cepas ASP041, ASP040 y ASP026) y agua-Tween20 (tratamiento control) (Fotografía del autor).

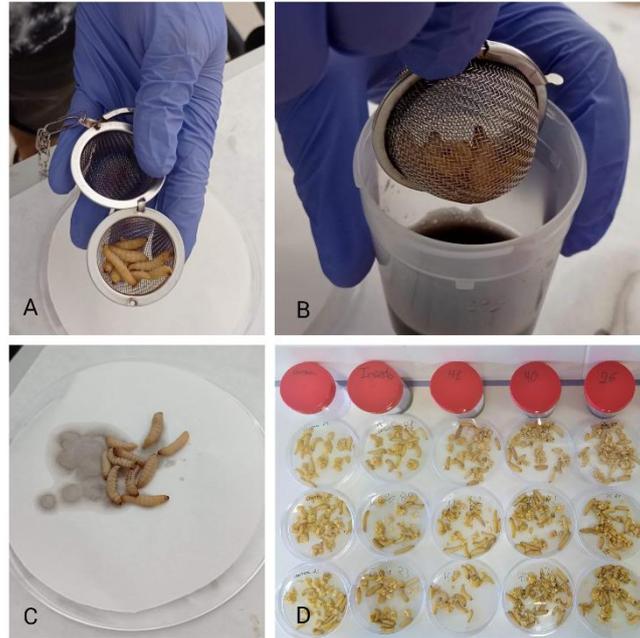
**Tabla 4.** Concentración (conidios/mL) de la suspensión conidial de cada cepa utilizada en las inoculaciones.

|             | <i>Aspergillus tubingensis</i> | <i>Aspergillus flavus</i> |                    |                    |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Cepa        | FIT-22014                      | ASP041                    | ASP040             | ASP026             |
| Conidios/mL | $1.16 \times 10^8$             | $1.00 \times 10^8$        | $1.10 \times 10^8$ | $1.01 \times 10^8$ |

- Inoculación mediante inmersión.

Las larvas de *G. mellonella* se inocularon por inmersión en la suspensión conidial. Para ello se colocaron 10 larvas en un filtro de té metálico que se sumergieron en la suspensión durante 20s. Posteriormente, las larvas se dejaron secar sobre un papel de

filtro y se depositaron en una placa Petri con la dieta anteriormente descrita (Figura 6).



**Figura 6.** A) Larvas de *Galleria mellonella* en un filtro metálico para infusiones. B) Inmersión de larvas en una suspensión conidial. C) Secado de larvas en papel de filtro tras la inmersión. D) Larvas repartidas en 15 placas Petri con dieta. (Fotografía del autor).

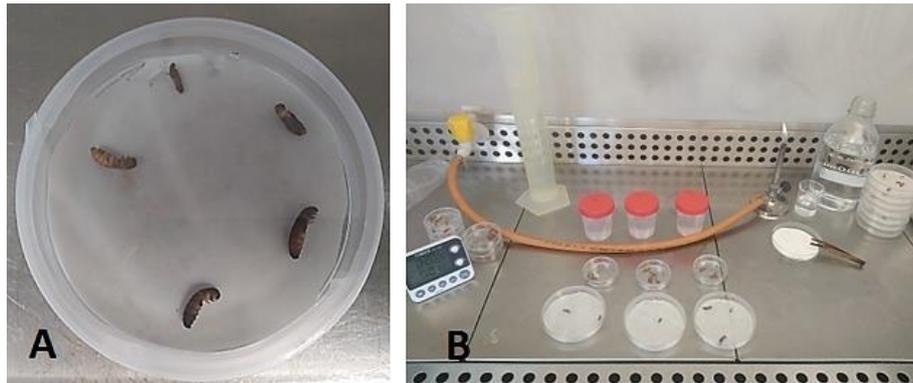
La inoculación se repitió tres veces con cada una de las cinco suspensiones conidiales (cuatro cepas más el control, agua estéril con Tween20 al 0.2%). Por lo tanto, se obtuvieron 15 grupos inoculados (3x5) con 10 larvas cada uno, haciendo un total de 150 larvas, aunque durante la manipulación de los insectos hubo 12 bajas. Por lo tanto, el total inicial de larvas fue de 138 con 26 - 29 larvas por cepa.

Las larvas se dejaron en las placas durante 12 días y diariamente se renovó la comida y realizó un recuento de larvas muertas y pupas que iban apareciendo, las cuales se apartaban a otras placas vacías.

Tras los 12 días, las larvas que habían muerto se desinfectaron superficialmente, para ello se sumergieron durante 1 min. en un frasco de 150 mL de polipropileno estéril con hipoclorito sódico al 1% en su interior. Las larvas desinfectadas se aclararon durante 1 min. en un frasco sólo con agua estéril y, para terminar, 1 min. más en otro frasco con agua estéril. Los frascos fueron renovados con cada cepa para evitar posibles contaminaciones entre ellas. Al final de la desinfección de los insectos, de cada tratamiento se sembraron 100  $\mu$ L del último agua de lavado en PDA para comprobar

que la larva estaba exenta de conidios externos de los hongos.

Las larvas desinfectadas se colocaron separados lo máximo posible en una placa Petri con papel de filtro húmedo (0,75 mL agua estéril) e introdujeron en cámaras húmedas durante 7 días para acelerar el desarrollo de las colonias fúngicas provenientes del interior de las larvas y causantes de sus muertes (Figura 7).



**Figura 7.** A) Larvas de *Galleria mellonella* muertas en forma de cinco corazones sobre papel de filtro húmedo. B) Material de trabajo para la desinfestación de larvas muertas. (Fotografía del autor).

- **Análisis de datos**

El análisis de mortalidad y efectos subletales se llevó a cabo mediante el uso de un modelo lineal generalizado (distribución=binomial; link=logit). La comparación entre tratamientos se realizó con un test  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ) (JMP 8.0, 2008 SAS Institute INC.). Tanto la gráfica de supervivencia como la medida de los valores de Tiempo Medio de Supervivencia (TMS) se calcularon con el método de supervivencia Kaplan-Meier y se compararon mediante el test Log-rank con el programa estadístico SPSS 28.0 para Windows.

### 3. RESULTADOS

---

#### 3.1 Identificación morfológica de la cepa FIT-22014.

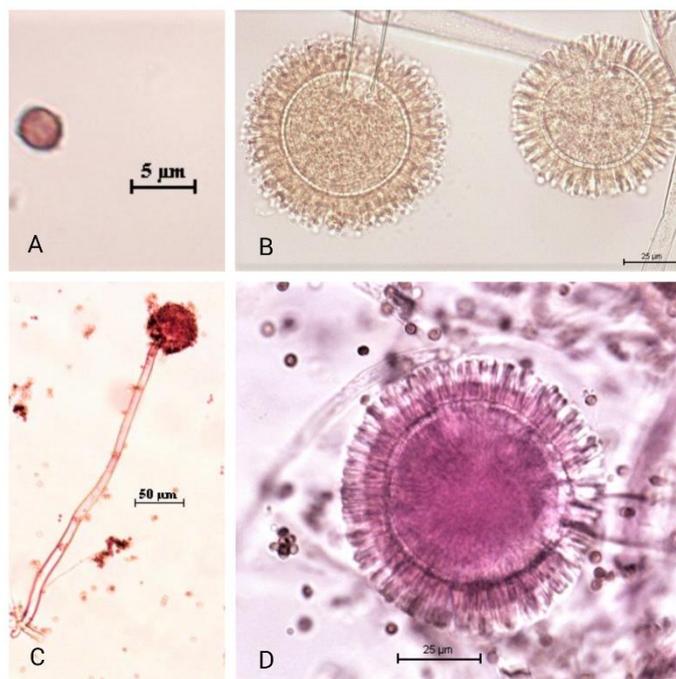
- Características macroscópicas.

La cepa mostraba una colonia de color oscuro, prácticamente negro, debido al color en masa de las conidias. El substrato fue amarillento en PDA. El micelio presentaba un color blanquecino y el tamaño medio de la colonia en PDA era de unos 60 mm a los 10 días a 30°C. Las características descritas son compatibles con *Aspergillus* section *Nigri*.

- Características microscópicas.

La cepa FIT-22014 mostró conidióforos característicos del género *Aspergillus*. Las conidias eran de color negro con superficie rugosa de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El estipe era hialino de unos 600-700  $\mu\text{m}$  de longitud por 14-17  $\mu\text{m}$  de ancho y una vesícula redondeada y biseriada de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una métula y unas fiálicas de 5-7 y 4-6  $\mu\text{m}$  de longitud respectivamente (Figura 8).

Siguiendo la clave taxonómica para la identificación de especies del género *Aspergillus* realizada por Klich, 2002, la cepa FIT-22014 era presumiblemente *A. niger*. Pero como bien indica Frías De León, 2018, no es posible diferenciar morfológicamente entre *A. niger* y *A. tubingensis*, por lo que fue necesario analizar molecularmente la cepa para verificar de que especie se trataba.



**Figura 8.** Características morfológicas de la cepa FIT-22014 de *Aspergillus tubingensis*. A) Conidio tintado con fucsina. B) Vesículas vistas sin tinción. C) Conidióforo tintado con fucsina donde se ve el estipe completo. D) Vesícula y esporas tintadas con fucsina. Se aprecia una clara diferencia entre la métula y las fiálides. (Fotografía del autor).

### 3.2 Identificación molecular de la cepa FIT-22014.

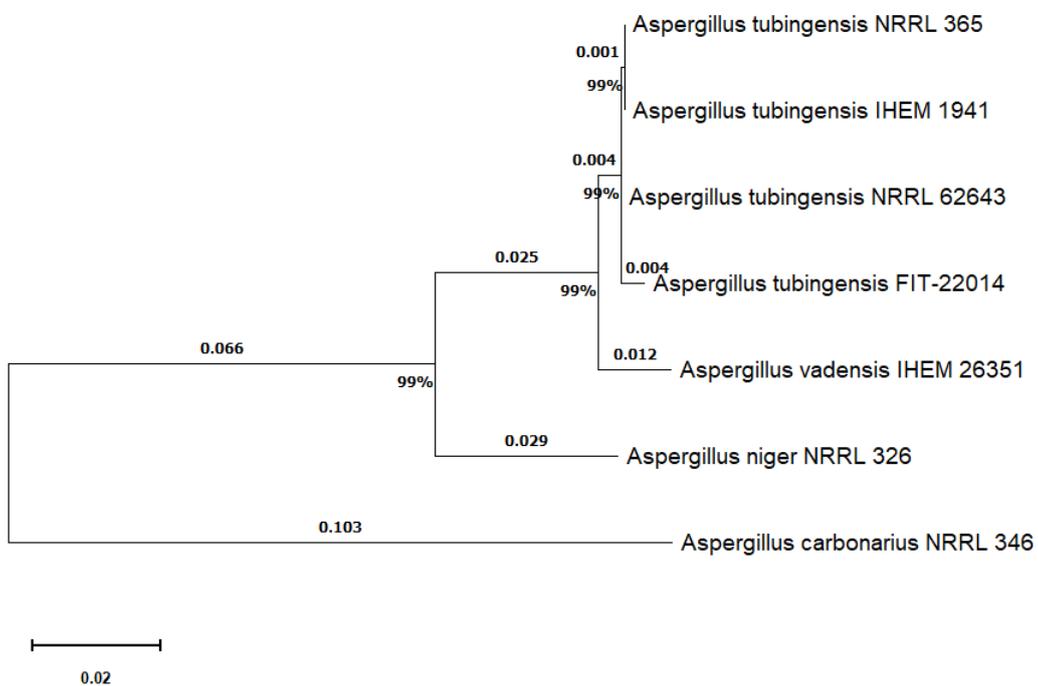
Los datos recogidos mediante la secuenciación molecular realizada a la cepa FIT-22014 (Tabla 5), los cuales fueron estudiados mediante BLAST, mostraron una homología del 100, 99 y 100 % con ITS (MG991653.1),  $\beta$ -tubulina (MH644904.1) y calmodulina (DQ902579.1), respectivamente, con accesiones de estudios de referencia de la especie *A. tubingensis*. Además, se observó una homología del 99% con la secuencia *A. nigri* región ITS (accesión: MH855928.1) (Vu et al., 2018).

**Tabla 5.** Homología de las secuencias estudiadas de la cepa FIT-22014.

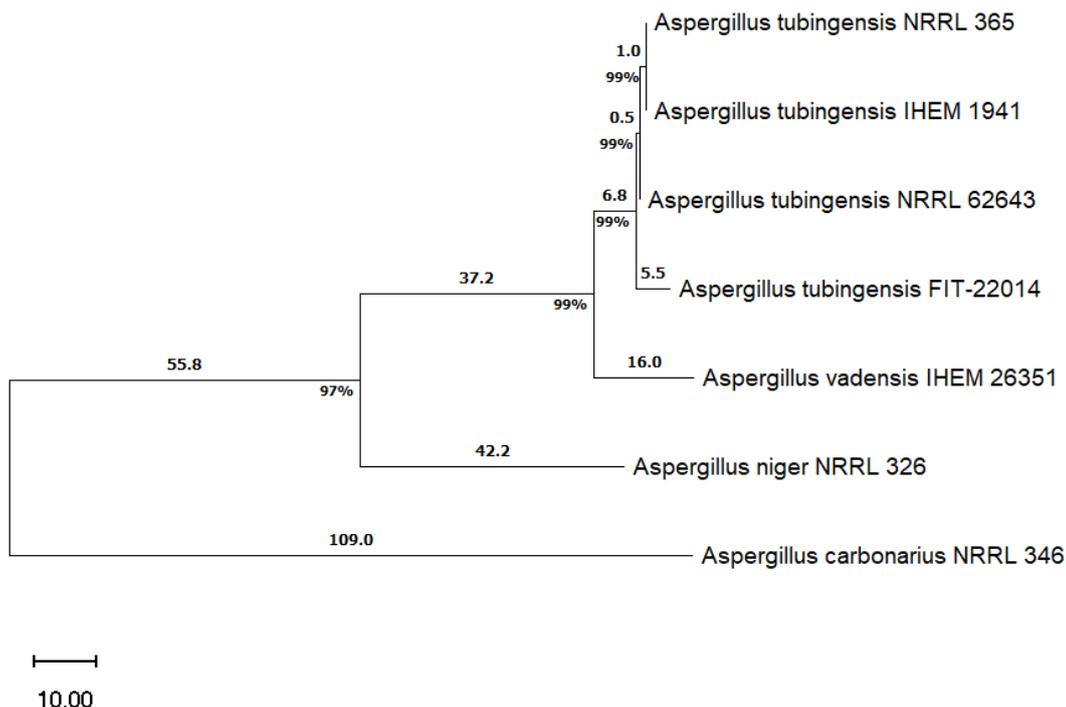
| Región estudiada | <i>Aspergillus niger</i> |             |            |                 | <i>Aspergillus tubingensis</i> |             |            |                      |
|------------------|--------------------------|-------------|------------|-----------------|--------------------------------|-------------|------------|----------------------|
|                  | Total Score              | Query Cover | Accession  | Referencia      | Total Score                    | Query Cover | Accession  | Referencia           |
| ITS              | 1026                     | 99%         | MH855928.1 | Vu et al., 2018 | 1022                           | 100%        | MG991653.1 | Xu et al., 2020      |
| CMD              | -                        | -           | -          | -               | 922                            | 99%         | MH644904.1 | D'hooge et al., 2019 |
| BT2              | -                        | -           | -          | -               | 942                            | 100%        | DQ902579.1 | He et al., 2008      |

Aunque, como ha sido denunciado reiteradamente, la región ITS se considera una región con escasa capacidad de discriminar a nivel de especie en el género *Aspergillus* (Samson et al., 2014). Atendiendo a la taxonomía integrativa propuesta, la cepa FIT-22014 fue identificada como *A. tubingensis*.

Para la construcción del árbol filogenético por máxima verosimilitud se utilizó el modelo evolutivo Tamura-Nei (T92+G) por ser el que mejor se ajustaba a nuestros datos.



**Figura 9.** Árbol filogenético reconstruido mediante el método de máxima verosimilitud, basado en las secuencias obtenidas a partir de los cebadores de ITS,  $\beta$ -tubulina y calmodulina de la cepa FIT-22014 y secuencias de *Aspergillus* section *Nigri* de la base de datos GenBank. Un valor bajo de los nodos representa una divergencia evolutiva más reciente. La reconstrucción del árbol se realizó utilizando el software de análisis filogenético MEGA 11. Los números en los nodos indican el porcentaje de bases utilizadas por el programa, obtenido a partir de 2000 repeticiones.

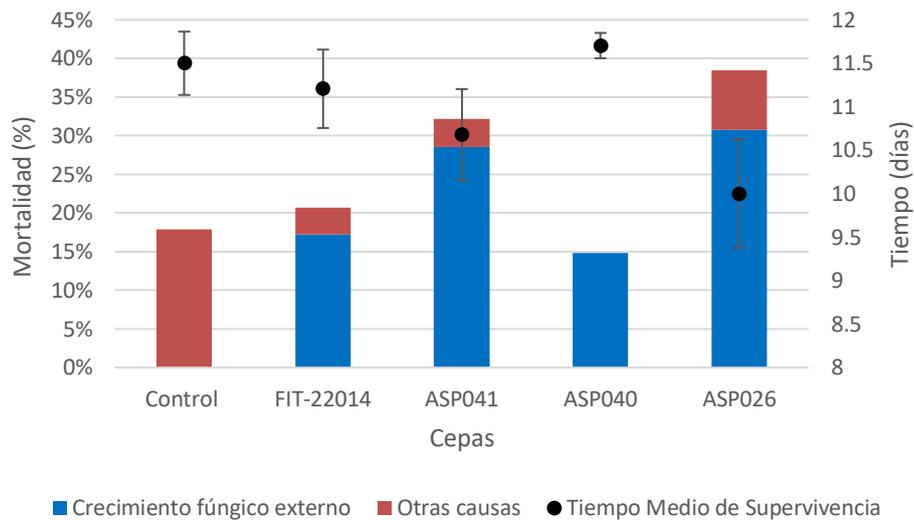


**Figura 10.** Árbol filogenético reconstruido mediante el método de máxima verosimilitud, basado en las secuencias obtenidas a partir de los cebadores de ITS,  $\beta$ -tubulina y calmodulina de la cepa FIT-22014 y secuencias de *Aspergillus* section *Nigri* de la base de datos GenBank. Las distancias entre los nodos representan el número mínimo de cambios evolutivos necesarios para explicar las diferencias observadas. La reconstrucción del árbol se realizó utilizando el software de análisis filogenético MEGA 11. Los números en los nodos indican el porcentaje de bases utilizadas por el programa, obtenido a partir de 2000 repeticiones.

Los resultados obtenidos a partir del análisis del árbol filogenético ilustran que la cepa FIT-22014 se sitúa dentro del mismo clado que las demás cepas de *A. tubingensis*, presentando una separación taxonómica evidente respecto a cepas pertenecientes a especies estrechamente relacionadas, tales como *A. vadensis* o *A. niger*.

### 3.3 Evaluación de la mortalidad y tiempo medio de supervivencia de larvas de *G. mellonella*.

Los tratamientos realizados con las cuatro cepas de *Aspergillus* no mostraron diferencias significativas con el control en la mortalidad total de larvas de *G. mellonella* inoculadas por inmersión con sus suspensiones ( $\chi^2$  (4) = 5.7872 / P = 0.2156). Los valores de mortalidad total oscilaron entre 14.81% para la cepa ASP040 y 38.46% para la cepa ASP026 (Figura 11).



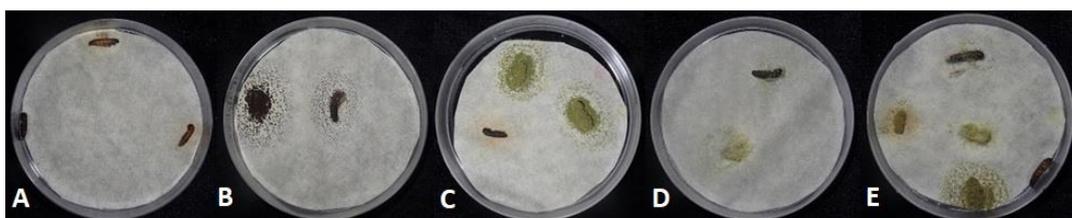
**Figura 11.** Mortalidad total en porcentaje de las larvas tratadas con cada cepa y sus Tiempos Medios de Supervivencia (TMS). La mortalidad se evaluó durante 12 días.

Sin embargo, sí hubo diferencias significativas en la mortalidad constatada con crecimiento fúngico externo entre los tratados con las cepas de *Aspergillus* y el control ( $\chi^2 (4) = 17.6049 / P = 0.0015$ ) (Tabla 6). La cepa ASP026 fue la que causó mayor valor de mortalidad con crecimiento fúngico (30.77%), mientras que la cepa FIT-22014 procedente del insecto solo mostró un 17.24% de mortalidad con crecimiento fúngico. El Tiempo Medio de Supervivencia (TMS) de las larvas ha sido de 10 días para la cepa ASP026 y el mayor, de 11.7 días, para la cepa ASP040. (Figura 11).

**Tabla 6.** Probabilidad de que haya diferencias entre el control y las diferentes cepas.

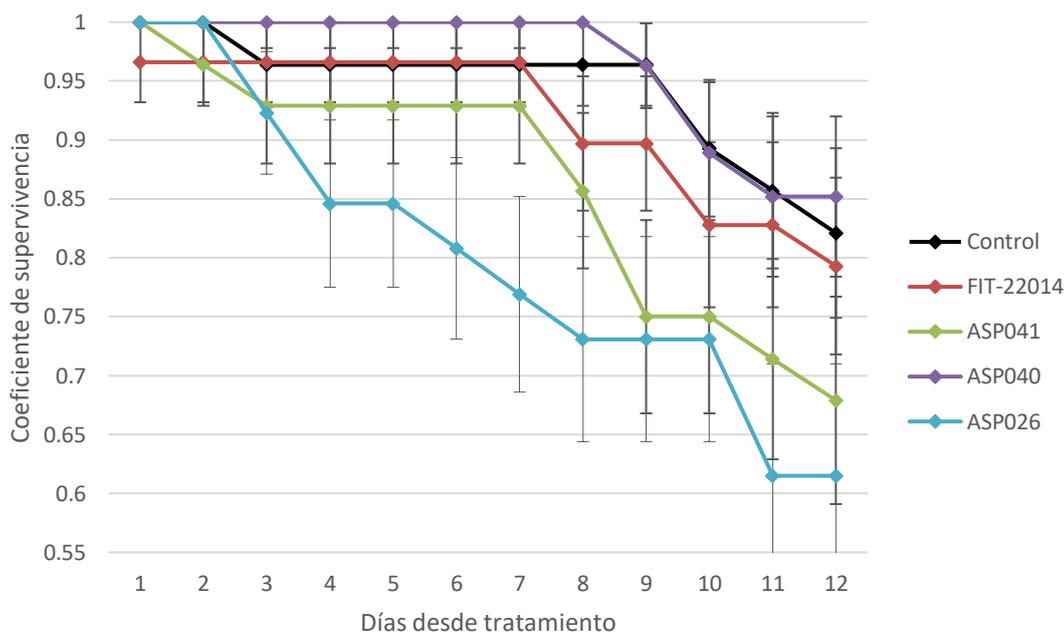
|         | FIT-22014 | ASP041 | ASP040 | ASP026 |
|---------|-----------|--------|--------|--------|
| CONTROL | 0.0017    | 0.0003 | 0.0004 | 0.001  |

La figura 12 presenta un ejemplo de cada uno de los tratamientos en el momento de evaluación de la mortalidad.



**Figura 12.** Larvas muertas tras 7 días en cámara húmeda: A) Control (replica 3). B) FIT-22014 (replica 1). C) ASP041 (replica 2). D) ASP040 (replica 1). E) ASP026 (replica 3). (Fotografía del autor).

En la Figura 13 se puede observar cómo la población larvaria de la cepa ASP026 disminuye de forma prácticamente continua a partir del segundo día, mientras que las poblaciones larvarias del resto de tratamientos lo hacen entre el séptimo y noveno día. Es decir, además de ser la cepa con mayor mortalidad causada, es la que origina la muerte en un menor tiempo.

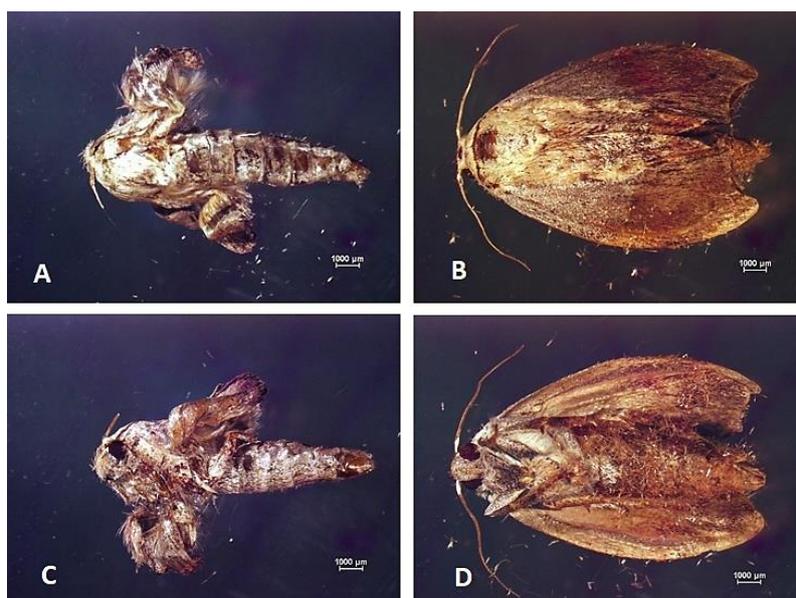


**Figura 13.** Evolución del coeficiente de supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* tratadas con las cuatro cepas de *Aspergillus* y el control. Los datos indican media  $\pm$  error estándar (EE).

- Efectos subletales producidos por el tratamiento en larvas de *G. mellonella*.

En el presente trabajo los efectos subletales encontrados han sido tanto adultos como pupas malformadas; en las cuales se encontraron insectos muertos (Tabla 7).

El único adulto malformado del ensayo ha aparecido en el tratamiento con FIT-22014, donde ha representado el 3.67% del total de la población inoculada con la cepa. Este se ha caracterizado sobre todo por un desarrollo alar anormal, donde las alas a parte de no alcanzar el tamaño normal también aparecen dobladas y estranguladas (Figura 14).



**Figura 14.** Diferencias entre un adulto de *Galleria mellonella* malformado infestado con la cepa FIT-22014 y uno sano: A) y B) Dorso del adulto malformado y del sano, respectivamente. C) y D) Torsos del adulto malformado y del sano, respectivamente. (Fotografía del autor).

Se han observado pupas malformadas en dos de las 138 larvas tratadas, una en el tratamiento con la cepa FIT-22014 y otra con ASP041. Estas pupas representaron el 3.33% de las poblaciones totales en cada tratamiento. Estas pupas malformadas presentaron una ausencia de la zona anterior, lo que indica un desarrollo incompleto.

Si consideramos que el crecimiento fúngico externo causó una mortalidad del 28.57% en el tratamiento con ASP041, y además tuvimos un efecto subletal del 3.33%, podemos concluir que esta cepa fue la que más redujo la población de insectos, concretamente en un 31.9%.

**Tabla 7.** Porcentajes de adultos y pupas malformados de *Galleria mellonella* (media y error estándar).

| Tratamiento | Adultos malformados |       | Pupas malformadas |       |
|-------------|---------------------|-------|-------------------|-------|
|             | Media (%)           | E.E.  | Media (%)         | E.E.  |
| Control     | 0                   | 0     | 0                 | 0     |
| FIT-22014   | 3.67                | 0.037 | 3.33              | 0.033 |
| ASP041      | 0                   | 0     | 3.33              | 0.033 |
| ASP040      | 0                   | 0     | 0                 | 0     |
| ASP026      | 0                   | 0     | 0                 | 0     |

## 4. DISCUSIÓN

---

Las especies del género *Aspergillus* son, por lo general, especies ubicuas que muestran una amplia diversidad de estilos de vida, que abarcan entornos clínicos, industriales y agrícolas. Algunas de estas especies pueden ser patógenos oportunistas de una amplia gama de organismos, pero otras han mostrado ser entomopatógenas de plagas agrícolas y de insectos vectores (Yan et al., 2022). El principal objetivo del presente TFM ha sido comprobar que la cepa FIT-22014, aislada de los adultos de clitra *Labidostomis lusitanica*, mostraba capacidad entomopatógena, así como su identificación molecular. Además, se ha evaluado la capacidad entomopatógena de cepas atoxigénicas de *A. flavus* que han sido seleccionadas para uso como agentes de biocontrol para reducir la contaminación de aflatoxinas en pistacho.

La identificación morfológica inicial mostraba que las características de las cepas aisladas del adulto de clitra eran compatibles con *A. niger*. Tras la secuenciación de su ADN y comparación de su secuencia con las de otras especies, la cepa de interés mostró homología (99%) con *A. tubingensis*. Ambas especies, *A. niger* y *A. tubingensis*, muestran similares características morfológicas como son una vesícula biseriada con conidios negros, rugosos y menores de 5  $\mu\text{m}$  (Klich, 2002). En España, *A. tubingensis* ha sido descrito previamente causando podredumbre de uva por Medina et al (2005) y cabe destacar que, en general, esta especie se considera no productora de micotoxinas (Storari et al., 2012), aunque se han detectado numerosas excepciones (Medina et al., 2005).

La cepa FIT-22014 y las otras tres cepas de *A. flavus*, no productoras de aflatoxinas, mostraron capacidad entomopatógena. En particular, la cepa FIT-22014, objeto de este TFM, redujo la población de *Galleria mellonella* en un 24.14%, teniendo en cuenta la mortalidad total y sus efectos subletales. La especie *A. tubingensis* se ha aislado previamente en *Cimex hemipterus* F. (Hemiptera: Cimicidae), si bien, no se habían desinfestado los cadáveres y por tanto su estado de vida podría ser saprófito, aunque la mortalidad alcanzó el 90% al día 14 con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL (Zahran et al., 2017).

Respecto a las cepas de *A. flavus*, resaltar que las mortalidades causadas por ASP041 y ASP026 fueron superiores a las de FIT-22014 de *A. tubingensis*. De ellas destaca la cepa

ASP041 con una reducción total de la población de 31.9% teniendo en cuenta la mortalidad total y los efectos subletales causados. La especie *A. flavus* es bien conocida como entomopatógena frente a diversos insectos como *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), *Blattella germanica* L. (Blattoidea: Blattellidae), *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera: Acrididae), y algunos fitófagos del cocotero (Gupta & Gopal, 2002; Kulshrestha & Pathak, 1997; Venkatesh et al., 1975).

Aunque la mortalidad frente a *G. mellonella* no superó el 50%, los resultados son muy prometedores en cuanto a su utilización combinada: reduciendo las aflatoxinas en campo y disminuyendo los fitófagos. Actualmente se utilizan cepas atóxicas de esta especie, como las seleccionadas en este TFM, para realizar un biocontrol de aflatoxinas en campos de pistacheros desplazando a las cepas aflatóxicas que aparecen frecuentemente en estos cultivos (Doster et al., 2014). De esta manera, incrementar las poblaciones de cepas atoxigénicas de *A. flavus* en los campos de pistacheros ayudaría al control de *L. lusitanica* a la vez que disminuye el contenido de aflatoxinas en el fruto, produciéndose un ahorro en costes de insecticidas y pérdidas por frutos infestados.

Un aspecto fundamental para considerar es la posible influencia de estas cepas fúngicas sobre las poblaciones de enemigos naturales de *L. lusitanica* y de otras plagas que afectan al cultivo del pistacho. Los enemigos naturales más comunes suelen pertenecer a los órdenes Hymenoptera, Diptera, Heteroptera y Neuroptera. Sin embargo, no se han documentado registros de que *A. flavus* tenga capacidad entomopatógena contra estos órdenes, sin embargo, cabe destacar que hay cuatro especies del orden Coleoptera, como son los coccinélidos *Oenopia conglobata*, *Rhyzobius lophanthae*, *Chilocorus bipustulatus* y *Exochomus quadripustulatus*, que son considerados enemigos naturales, lo que podría aumentar la probabilidad de que la población de estos insectos se viera afectada por las cepas fúngicas, al igual que ocurre con la de *L. lusitanica* (MAPA, 2018). Sería interesante profundizar en estas relaciones multitróficas entre *Aspergillus* sp., *L. lusitanica* y sus entomófagos, para compatibilizar los tratamientos.

Este TFM ha marcado el inicio de una posible utilización de cepas de *Aspergillus tubingensis* o *Aspergillus flavus* para una estrategia integrada de control de plagas y enfermedades.

## 5. CONCLUSIONES

---

- La cepa FIT-22014 aislada de adultos de clitra *Labidostomis lusitanica* pertenece a la especie fúngica *Aspergillus tubingensis*.
- Tanto la cepa FIT-22014 de *A. tubingensis* como las cepas ASP041, ASP040 y ASP026 de *Aspergillus flavus* son entomopatógenas.
- La cepa ASP026 produjo la mayor mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* con un 30.77% y menor Tiempo Medio de Supervivencia de 10 días.
- La cepa ASP041 fue la que más redujo la población de *G. mellonella* teniendo en cuenta efectos letales y subletales.
- El empleo de las cepas ASP026 y ASP041 de *A. flavus* para reducir el contenido de aflatoxinas en fruto y controlar fitófagos podría disminuir los costes de producción dentro de una estrategia de control integrado de plagas y enfermedades.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

**Bhan, S., Shrankhla, M. L., & Srivastava, C. N.** (2013). Larvicidal toxicity of Temephos and entomopathogenic fungus, *Aspergillus flavus* and their synergistic activity against malaria vector, *Anopheles stephensi*. *Journal of Entomology and Zoology studies*, 1(6), 55-60.

**Couceiro López, J.F., Guerrero Villaseñor, J., Gijón López, M. del C., Moriana Elvira, A., Pérez López, D., & Rodríguez de Francisco, M.** (2017). *El cultivo del pistacho* (2a edición). Mundi-Prensa.

**D'hooge, E., Becker, P., Stubbe, D., Normand, A. C., Piarroux, R., & Hendrickx, M.** (2019). Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? *Medical Mycology*, 57(6), 773-780.

**Doster, M. A., Cotty, P. J., & Michailides, T. J.** (2014). Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards. *Plant Disease*, 98(7): 948-956.

**EPPO (European Plant Protection Organization)** (2022). *Pistacia vera* (PIAVE) [Overview] EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/PIAVE> (consulta realizada el 21/11/22).

**ESYRCE** (2021). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

**Fitriana, Y., Suharjo, R., Swibawa, I. G., Semenguk, B., Pasaribu, L. T., Hartaman, M., Rwandini, R. A., Indriyati, I., Purnomo, P. & Solikhin, S.** (2021). *Aspergillus oryzae* and *Beauveria bassiana* as entomopathogenic fungi of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) infesting corn in Lampung, Indonesia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-12.

**Frías-De-León, M. G., Rosas-de Paz, E., Arenas, R., Atoche, C., Duarte-Escalante, E., de Soschin, D. M., Acosta-Altamirano, G. & Reyes-Montes, M. R.** (2018). Identification of *Aspergillus tubingensis* in a primary skin infection. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(2), 274-278.

**García Lopez, M. T., Gordon, A., Puckett, R. D., Chevaller, C., Doster, M., Michailides,**

**T., & Moral, J.** (2022). Pistachio male inflorescences as an alternative substrate for the application of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Plant Disease*. 10.1094/PDIS-09-22-2109-RE

**Glass, N. L., & Donaldson, G. C.** (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.

**Gómez, S. R., Gil-Tapetado, D., García-Gila, J., Blasco-Aróstegui, J., & Polidori, C.** (2022). The leaf beetle *Labidostomis lusitanica* (Coleoptera: Chrysomelidae) as an Iberian pistachio pest: projecting risky areas. *Pest Management Science*, 78(1), 217-229.

**Gupta, A., & Gopal, M.** (2002). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates pathogenic to coconut insect pests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 329-335.

**He, C., Fan, Y., Liu, G., & Zhang, H.** (2008). Isolation and identification of a strain of *Aspergillus tubingensis* with deoxynivalenol biotransformation capability. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12), 2366-2375.

**Hong, S.** (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316-1329

**Klich, M. A.** (2002). Identification of common *Aspergillus species*. *CBS*.

**Kulshrestha, V., & Pathak, S. C.** (1997). Aspergillosis in German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Blattoidea: blattellidae). *Mycopathologia*, 139, 75-78.

**Lin, W. J., Chiu, M. C., Lin, C. C., Chung, Y. K., & Chou, J. Y.** (2021). Efficacy of Entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius* against *Dolichoderus thoracicus*. *BioControl*, 66, 463-473.

**MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)** (2018). Guía de gestión integrada de plagas: Pistacho. Gobierno de España, Madrid.

**MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)** (2022). Registro de productos fitosanitarios. <https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb#> (consulta realizada el 2/12/22).

**Mazid, S., Rajkhowa, R. C., & Kalita, J. C.** (2015). Pathogenicity of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on red spider mite (*Oligonychus coffeae* Nietner), a serious pest of tea. *Journal of Entomology Zoology Studies*, 3(3), 11-13.

**Medina, A., Mateo, R., López-Ocana, L., Valle-Algarra, F. M., & Jiménez, M.** (2005). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4696-4702.

**Moral, J., García-Lopez, M. T., Camiletti, B. X., Jaime, R., Michailides, T. J., Bandyopadhyay, R., & Ortega-Beltran, A.** (2020). Present status and perspective on the future use of aflatoxin biocontrol products. *Agronomy*, 10(4), 491.

**Reiss, J.** (1975). Insecticidal and larvicidal activities of the mycotoxins aflatoxin B<sub>1</sub>, rubratoxin B, patulin and diacetoxyscirpenol towards *Drosophila melanogaster*. *Chemico-biological Interactions*, 10(5), 339-342.

**Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. Y., & Frisvad, J. C.** (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141-173.

**Seye, F., Bawin, T., Boukraa, S., Zimmer, J. Y., Ndiaye, M., Delvigne, F., & Francis, F.** (2014). Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 49, 453-458.

**Storari, M., Bigler, L., Gessler, C., & Brogгинi, G. A.** (2012). Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(9), 1450-1454.

**White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

**Xu, Y., Chen, M., Zhu, J., van den Ende, B. G., Chen, A. J., Al-Hatmi, A. M., Li, L., Zhang,**

**Q., Xu, J., Liao, W. & Chen, Y.** (2020). *Aspergillus* species in lower respiratory tract of hospitalized patients from Shanghai, China: species diversity and emerging azole resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 4663.

**Yan, J., Liu, H., Idrees, A., Chen, F., Lu, H., Ouyang, G., & Meng, X.** (2022). First Record of *Aspergillus fijiensis* as an Entomopathogenic Fungus against Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Journal of Fungi*, 8(11), 1222.

**Venkatesh, M. V., Joshi, K. R., Harjai, S. C., & Ramdeo, I. N.** (1975). Aspergillosis in desert locust (*Schistocerca gregaria* Forsk). *Mycopathologia*, 57(3), 135-138.

**Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, V, Verkley, G. J. M.** (2018). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 91(1), 23-36.

**Zahran, Z., Nor, N. M. I. M., Dieng, H., Satho, T., & Ab Majid, A. H.** (2017). Laboratory efficacy of mycoparasitic fungi (*Aspergillus tubingensis* and *Trichoderma harzianum*) against tropical bed bugs (*Cimex hemipterus*) (Hemiptera: Cimicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4), 288-293.

**Zhang, P., You, Y., Song, Y., Wang, Y., & Zhang, L.** (2015). First record of *Aspergillus oryzae* (Eurotiales: Trichocomaceae) as an entomopathogenic fungus of the locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Biocontrol Science and Technology*, 25(11), 1285-1298.

**Zimmermann, G.** (1986). The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.