

Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia

María del Carmen Fernández Bravo
Tesis Doctoral-2017



TITULO: *DIVERSIDAD, DINÁMICA POBLACIONAL Y ECOLOGÍA DE HONGOS
ENTOMOPATOGENOS DE SUELO Y FILOPLANO DE SISTEMAS
AGROFORESTALES MEDITERRANEOS Y EFECTO DE LA
RADIACIÓN UV-B SOBRE SU VIRULENCIA*

AUTOR: *María del Carmen Fernández Bravo*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes
Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales

Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia

Tesis Presentada por Dña. **María del Carmen Fernández Bravo** para optar al grado de Doctora Ingeniera de Montes

Fdo.: **María del Carmen Fernández Bravo**

VºBº del Director

Fdo.: Prof. D. Enrique Quesada Moraga
Catedrático de Universidad
E.T.S.I.A.M.
Universidad de Córdoba
Córdoba, mayo de 2017

VºBº del Codirector

Fdo.: Dra. Dña. Inmaculada Garrido Jurado
Investigadora Juan de la Cierva
E.T.S.I.A.M.
Universidad de Córdoba
Córdoba, mayo de 2017



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

School of Agricultural and Forestry Engineering
Department of Agricultural and Forestry Sciences

Diversity, population dynamics and ecology of entomopathogenic fungi from soil and phylloplanes of Mediterranean agroforestry systems and effect of UV-B radiation on their virulence

Thesis presented by Mrs. **María del Carmen Fernández Bravo** to qualify for the degree of Doctor Forest Engineer

Signed **María del Carmen Fernández Bravo**

VºBº of Director

Signed: Prof. Mr. Enrique Quesada Moraga
University Full Professor
E.T.S.I.A.M.
University of Córdoba
Córdoba, May, 2017

VºBº of Codirector

Signed: Dr. Mrs. Inmaculada Garrido Jurado
Juan de la Cierva Researcher
E.T.S.I.A.M.
University of Córdoba
Córdoba, May, 2017



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

El Prof. D. Enrique Quesada Moraga, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor Catedrático de Producción Vegetal de la Universidad de Córdoba en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M., y Responsable del Grupo PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola”, y la Dra. Inmaculada Garrido Jurado, Doctora Ingeniero Agrónomo, Investigadora Juan de la Cierva en la Universidad de Córdoba, en el Departamento de Ciencia y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M.

INFORMAN: que el trabajo “Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia” realizado bajo nuestra dirección por la Ingeniera de Montes Dña. María de Carmen Fernández Bravo, lo consideramos ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, mayo de 2017

Fdo.: Prof. D. Enrique Quesada Moraga

Fdo.: Dra. Dña. Inmaculada Garrido Jurado



TÍTULO DE LA TESIS: Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia.

DOCTORANDO/A: María del Carmen Fernández Bravo.

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Doctoranda María del Carmen Fernández Bravo ha realizado la Tesis Doctoral titulada: **“Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia”**. Este trabajo se considera finalizado y reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa. A lo largo de su investigación la Doctoranda ha contribuido con diversas aportaciones de interés para la comunidad científica. Este trabajo supone un avance importante en el estudio de la diversidad, dinámica poblacional y ecología de los hongos entomopatógenos en el suelo y filoplano de los ecosistemas agroforestales mediterráneos. Los resultados obtenidos en esta Tesis pueden ayudar en la toma de decisiones sobre la elección de cepas de hongos entomopatógenos mejor adaptadas al medio natural en el que van a ser aplicadas, esto es, cepas con competencia ambiental. Además, este trabajo aporta datos inéditos y relevantes sobre la presencia natural, ecología y dinámica poblacional de estos hongos en su relación con la planta, profundizando incluso en el efecto del grado de intensificación del ecosistema sobre las mismas.

El trabajo ha sido realizado en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M. de la Universidad de Córdoba, el cual ha sido difundido de diferentes formas: Tres artículos en revistas de prestigio científico indexadas en la base de datos JCR, dos de ellos publicados y el tercero aceptado y en prensa, los tres en Q1. También se han difundido los trabajos de la tesis en seis comunicaciones a congresos internacionales, cinco orales y un póster, así como cuatro comunicaciones en congresos nacionales, tres de ellas

orales y un póster.

Además de su línea de investigación, durante su Tesis, la doctoranda se ha implicado en otras líneas de investigación del grupo PAIDI AGR 163, lo que le ha permitido una formación muy amplia en Entomología Agrícola y Forestal, tanto en el reconocimiento de fitófagos como en las medidas de luchas más adecuada, con énfasis en el uso de los hongos entomopatógenos y sus compuestos insecticidas. Como resultado de esta actividad complementaria, ha presentado numerosas comunicaciones en congresos nacionales e internacionales e incluso es coautora de otro trabajo Q1 en una revista JCR (SCI).

Esta labor investigadora de la doctoranda ha estado acompañada de otra muy importante en el ámbito docente. Su implicación en la docencia de las asignaturas de nuestra responsabilidad, Entomología Agrícola, Parásitos Animales de las Plantas Cultivadas, Aplicaciones Biotecnológicas en Entomología, Entomología Forestal etc., pertenecientes a las titulaciones de Ingeniería Agronómica e Ingeniería Forestal, y los grados de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural, y de Ingeniería Forestal de la E.T.S.I.A.M. de la UCO. Esta docencia ha quedado recogida en el PDD, y a tenor de las calificaciones que ha recibido por parte de los alumnos, sus clases teóricas y prácticas han sido de alto nivel. Además, la doctoranda ha sido codirectora durante este periodo de un Proyecto Fin de Carrera y tres Proyectos Fin de Grado, un logro adicional y muy importante en los ámbitos docente e investigador.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 2 de mayo de 2017

Firma del/de los director/es



Fdo.:Prof. Dr. Enrique Quesada Moraga Fdo.: Dra. Inmaculada Garrido Jurado

MENCIÓN DE DOCTORADO INTERNACIONAL

La presente Tesis Doctoral cumple los requisitos establecidos por la Universidad de Córdoba para la obtención del título de Doctor con Mención Internacional:

- Estancia internacional predoctoral de 4 meses (del 4 de Mayo al 31 de Agosto de 2015) en el “Federal Research Station Agroscope” en Zurich, Suiza, bajo la supervisión del Dr. Jürg Enkerli, Científico Sénior del grupo “Molecular Ecology”.

- La Tesis Doctoral cuenta con el informe previo de dos doctores externos con experiencia acreditada pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación diferente a España:
 - Dra. Paula Baptista, Departamento Biología e Biotecnología, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.
 - Dr. Eustachio Tarasco, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italy.

- Como miembro del tribunal, un doctor perteneciente a alguna institución de educación superior o centro de investigación no español forma parte del tribunal evaluador de la tesis: Dr. José A. Pereira, Investigador Sénior del Instituto Politécnico de Bragança, Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Portugal.

- Parte de la Tesis Doctoral, de acuerdo a la normativa, se ha redactado y se presentará en dos idiomas, castellano e inglés.

La Doctoranda



Fdo.: María del Carmen Fernández Bravo

TESIS POR COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Esta Tesis Doctoral cumple el requisito establecido por la Universidad de Córdoba para su presentación como compendio de artículos. Consiste en un mínimo de 3 artículos publicados o aceptados en revistas incluidas en los tres primeros cuartiles de la relación de revistas del ámbito de la especialidad y referenciadas en la última relación publicada por Journal Citation Report (SCI):

1. Garrido-Jurado, I.¹, **Fernández-Bravo, M.**¹, Campos, C., Quesada-Moraga, E., 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplane of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 97-106. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”. ¹Ambos autores contribuyen igual en este trabajo.
2. **Fernández-Bravo, M.**, Garrido-Jurado, I., Velarde-García, P., Enkerli, J., Quesada-Moraga, E., 2016. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. *Journal of Invertebrate Pathology* 144: 6-17. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”.
3. **Fernández-Bravo, M.**, Flores-León, A., Calero-López, S., Gutiérrez-Sánchez, F., Valverde-García, P., Quesada-Moraga, E., 2017. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. Strains. *Journal of Invertebrate Pathology*. Aceptado con “Major Revision” el 27 de marzo de 2017. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”.

La Doctoranda



Fdo.: María del Carmen Fernández Bravo

Los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados por los Proyectos AGL 2011-27646 y AGL 2016-80483-R del Ministerio de Economía y Competitividad. La doctoranda ha contado con la ayuda de una beca FPI del Ministerio de Economía y Competitividad para la realización de la presente Tesis Doctoral con referencia: BES-2012-058703.

Cada final es sólo el principio de otra historia

AGRADECIMIENTOS

Heme aquí al final de esta etapa y sólo tengo palabras de agradecimiento:

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Enrique Quesada Moraga por la gran oportunidad brindada durante todos estos años, por los conocimientos transmitidos y las experiencias vividas, gracias Enrique por acogerme en tu grupo y hacer realidad mi vocación profesional. A la Dra. Inmaculada Garrido Jurado por su esfuerzo, dedicación y paciencia.

A mis padres, Eugenio y María del Carmen, porque sin ellos, esto no habría sido posible. Primero por darme la vida, que no es poco, y en segundo lugar, por darme la oportunidad, haciendo un gran esfuerzo, de estudiar la carrera de Ingeniero de Montes, la cual me ha dado la posibilidad de estar donde estoy marcando así mi vida laboral y personal. Gracias por darme la oportunidad de poder crecer sin limitaciones.

A mi hermano y abuelas, que han sido un gran apoyo con su energía y cariño.

A Juan, que a pesar de haber llegado casi al final de esta etapa, ha marcado este tiempo de una forma que sólo tu y yo sabemos.

A la “familia” AGR 163, por todos estos años, por ser lo mejor cuando todo iba bien y un apoyo cuando no. Gracias por hacer más amenas todas las horas del día que pasamos juntos. A mis compis de despacho, Natalia y Meelad, porque no se puede tener mejor gente cerca. A María Victoria, que siempre nos está cuidando. A Alex y Silvia, siempre están ahí para todo, y que también están terminando la Tesis, ánimo!, ya queda poco!.

A Sandra, Carlos, Lola, Gloria, a “mis alumnos”, Alejandro, Salvador, Fernando y Elodie, a los visitantes de otros centros, y todo aquél que ha pasado por el laboratorio durante todos estos años (imposible recordarlos a todos), ya que de alguna manera han ido aportando granitos a este trabajo, ya sea de forma directa o indirecta, con su apoyo y consejo.

Al Dr. Cándido Santiago, que a pesar de estar jubilado, siempre está presente en nuestro grupo, y nosotros siempre deseando que venga a visitarnos.

A Pablo Valverde, super crack de las estadística y mejor persona, siempre encuentra el hueco para ayudarnos, gracias por todo!

A mi supervisor en Suiza, Jürg Enkerli y todo su equipo, por todo lo aprendido allí, que ha sido mucho, y enseñarme lo fantástica que puede ser la vida en otro país, a pesar de estar tan lejos del hogar y la familia.

A mis amigos, todos y cada uno de ellos, Lola, Patri, Charli, Tere, Ana, Ponce, Luis, y todos los que han pasado por mi vida estos años y que no tendría papel para poner todos sus nombres, porque de alguna forma han contribuido a que la realización de esta Tesis haya sido posible con su cariño y amistad.

Hoy toma sentido la frase de la Dra. Gloria Resquín “Cosas buenas ocurren hasta que lo haces”... que gran verdad...

Así que gracias a todos por formar parte de esta aventura durante todo éste tiempo. Nos vemos en la siguiente!

Resumen:

El control biológico por medio de hongos entomopatógenos emerge en la actualidad como la gran alternativa a los insecticidas químicos y ha despertado el interés de todos los agentes implicados en la protección de cultivos. Sin embargo, su éxito comercial e implantación progresiva se enfrentan con demasiada frecuencia a una barrera limitante, la falta de eficacia en campo, debido en gran parte a la poca competencia ambiental de las cepas seleccionadas, cuya actividad queda neutralizada por distintos factores bióticos y abióticos, donde destaca, dentro del espectro solar, la radiación UV-B. Esta Tesis ha pretendido dilucidar el efecto real de dicha radiación sobre la virulencia de los ascomycetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs), así como la presencia natural de estos hongos en el filoplano, donde las condiciones ambientales operantes no parecen favorables para su presencia, y su relación con la respuesta a las condiciones de temperatura, humedad y radiación UV-B.

A lo largo de los distintos capítulos de la presente Tesis Doctoral, se ha constatado la presencia, diversidad y dinámica poblacional de los AMEs en el suelo y filoplano de plantas herbáceas y leñosas en cinco ecosistemas mediterráneos con diferentes grados de manejo (olivar ecológico, olivar tradicional, reforestación de encina, dehesa y plantación de girasol), durante las cuatro estaciones de un año completo. Además, se ha evaluado la respuesta diferencial de aislados pertenecientes a varias especies de AMEs (procedentes de suelo y filoplano), a distintos factores abióticos de estrés (temperatura, humedad y radiación UV-B), determinantes de su presencia, persistencia y virulencia, con el fin de obtener herramientas útiles para la selección de cepas con competencia ambiental.

En el capítulo II, se evaluó la presencia, diversidad y dinámica poblacional de los AMEs presentes en el suelo y filoplano de plantas leñosas y herbáceas procedentes de cinco ecosistemas mediterráneos con diferentes grados de manejo durante un año completo. En total se aislaron 697 aislados de AMEs que se identificaron mediante su caracterización morfológica y la secuenciación del factor de elongación 1α (EF-1 α), lo que los incluyó en las especies: *Beauveria amorpha*, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense*, *M. robertsii*, *Paecilomyces marquandii* y *Purpureocillium lilacinum*. La riqueza de especies, la diversidad y la uniformidad se calcularon, mediante el uso de distintos índices, para cada ecosistema y hábitat, obteniéndose la siguiente clasificación que correlacionó la diversidad de los ecosistemas con la intensidad de manejo de los mismos: repoblación de encina > olivar ecológico > olivar tradicional > dehesa > plantación de girasol. Por otro lado, el análisis ISSR reveló una alta diversidad genotípica entre los aislados de *B. bassiana*, que no mostró una relación directa entre dicha característica genética y el hábitat de aislamiento de los AMEs (suelo o filoplano). Estos resultados sugieren que los aislados del filoplano tienen su origen en el suelo, su principal reservorio, los cuales son dispersados por agentes como el viento, la lluvia o la actividad de los insectos. No obstante, se detectó un grupo genético con aislados sólo procedentes del filoplano de encinas, que podría identificar a estos microorganismos como verdaderos epífitos.

En el capítulo III se evaluó la influencia del genotipo de los AMEs, el hábitat de aislamiento (suelo o filoplano) o la región geográfica de los mismos sobre su respuesta a los principales factores ambientales, temperatura, humedad y la radiación UV-B, condiciones que pueden afectar a su uso en el control microbiano, sobre todo en aplicaciones aéreas. Para ello, se seleccionaron 20 aislados de *B. bassiana* obtenidos del suelo y filoplano de encina, de dos de los cinco ecosistemas estudiados anteriormente (repoblación de encina y dehesa). Para ver la distribución poblacional de estos aislados y evaluar sus requerimientos térmicos, de humedad y UV-B, se caracterizaron mediante EF-1 α , la región nuclear intergénica Bloc y 15 marcadores microsatélites (SSR). Al igual que en los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se obtuvieron grupos genéticos que tenían aislados tanto de suelo como de filoplano en el mismo clado o genotipo, pero de nuevo apareció un grupo con solo aislados de filoplano, que podrían ser verdaderos epífitos. Para investigar la hipótesis de si los aislados de filoplano presentan una mayor respuesta a las condiciones de estrés ambiental en relación a los de suelo, se analizó el efecto de la temperatura (germinación y crecimiento de colonias evaluadas entre 15-35° C), la actividad de agua o a_w (germinación de conidios evaluada frente a valores de a_w entre 1 y 0.862) y la exposición a la radiación UV-B (920 o 1200 mW m⁻² durante 2, 4 ó 6 h). Como resultado

no se encontraron asociaciones entre el genotipo, el hábitat (suelo o filoplano) y el ecosistema de aislamiento, peso sí se encontraron aislados con un carácter excepcional frente al estrés ambiental típico de la zona mediterránea. Estos resultados no apoyan la hipótesis de partida de que los aislados de AMEs presentes en el filoplano de las plantas pudieran mostrar mayor tolerancia al estrés ambiental que los del suelo, si bien, indican que existen aislados con gran tolerancia a la ausencia de humedad (a_w), altas temperaturas y condiciones extremas de radiación UV-B, que son especialmente interesantes para su uso en el control integrado de plagas en zonas semiáridas.

Dado que la radiación UV-B parece ser el factor más limitante al que los AMEs están expuestos en el medio ambiente y principalmente en las zonas epigeas, en el capítulo IV se estudió si la respuesta a dicho estrés es la misma para todas las especies de AMEs y si ésta radiación afecta a la virulencia y viabilidad de los aislados en cuestión. Para ello se seleccionaron 18 cepas de 3 especies de *Metarhizium* sp.: *M. guizhouense*, *M. robertsii* y *M. brunneum*. En general, todas las cepas mostraron una disminución significativa en la germinación de los conidios que en ningún caso superó el 30%, así como una baja capacidad de recuperación de los mismos, siempre asociada con el tiempo de exposición. Sin embargo, y como ocurrió en el caso de *B. bassiana*, no se encontró relación entre las especies de *Metarhizium* o el hábitat de procedencia de la cepa (suelo o filoplano) y el efecto de la radiación UV-B. Finalmente, para determinar el efecto de la radiación UV-B sobre la virulencia de los AMEs tanto *in vitro* como *in vivo*, se seleccionó la cepa EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* que fue la que presentó una mayor resistencia a la radiación UV-B de todos los aislados con potencial para ser desarrollados como micoinsecticidas. En una primera serie de bioensayos, los conidios puros de la cepa en cuestión se irradiaron con 1200 mW m^{-2} durante 6 horas antes o después de inocular adultos de *C. capitata* con la misma, que dio lugar a una disminución significativa de mortalidad. Curiosamente, ésta pérdida de virulencia no se observó cuando los insectos fueron tratados con el hongo y luego irradiados sobre el exoesqueleto del mismo. No obstante, en ambos casos se observó una importante pérdida de viabilidad de los conidios, que alcanzó un 70%. Para determinar si la dosis del hongo aplicada puede explicar este fenómeno de pérdida de viabilidad y no de virulencia, se realizó una segunda serie de experimentos donde las moscas adultas de *C. capitata* se inocularon con cinco dosis de una suspensión a base de conidios puros de la cepa EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* (1.0×10^4 a 1.0×10^8 conidios ml^{-1}) y luego se irradiaron a 1200 mW m^{-2} durante 6 horas. Como resultado se obtuvieron valores similares de CL_{50} que fueron de 3.8×10^7 y 4.3×10^7 conidios ml^{-1} , para los insectos inoculados con el hongo e irradiados con radiación UV-B y los que no fueron irradiados, respectivamente. Dado que la dosis del hongo aplicado seguía sin explicar el fenómeno antes mencionado, se trataron moscas adultas con una suspensión de 1.0×10^8 conidios ml^{-1} y luego expuestos a 1200 mW m^{-2} durante 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. De acuerdo con el modelo logístico de 3 parámetros y el modelo exponencial, el tiempo de exposición a la radiación UV-B (1200 mW m^{-2}) necesario para reducir la mortalidad de los adultos de *C. capitata* fue de 47.2 horas, mientras que para reducir la viabilidad un 50% de los conidios sobre las moscas en las mismas condiciones fue de 5.6 horas. Estos resultados revelan la falta de correspondencia entre la pérdida de viabilidad de los conidios, aproximadamente el 85% independientemente de si el hongo es irradiado antes o después de tratar a los insectos, y la virulencia, pues la disminución de la primera por efecto de la radiación UV-B no es suficiente para evitar que un número viable de conidios restantes supere el umbral para comenzar el proceso patogénico.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral aportan herramientas que facilitan la búsqueda y selección de cepas AMEs mejor adaptadas a las condiciones ambientales mediterráneas y con mayor competencia ambiental a las zonas donde se van a utilizar, para superar, con ayuda de la formulación y el método de aplicación, la principal limitación para su eficaz desarrollo y empleo en campo en programas de control integrado de plagas.

Abstract:

Biological control is nowadays a great alternative to chemical insecticides, also biological control has awakened a great level of interest among all control agents involved in crop protection. However, the biological control agents have to overcome several barriers such as the low efficiency in the field, all of them due to a low environmental competence of the selected strains, which have a low tolerance to environmental stresses, particularly the ultraviolet radiation (UV-B). The current Doctoral Thesis focused on the real effect of different environmental stresses, in particular the UV-B radiation, on virulence of entomopathogenic mitosporic ascomycetes (AMEs) and their natural presence on the phylloplane, in which the environmental conditions could not be favorable for their presence.

Throughout chapters of this Thesis, it has been verified the presence, diversity and population dynamics of (EMAs) in the soil and phylloplane of weeds and woody plants in five Mediterranean ecosystems with different management degrees (organic olive orchard, traditional olive orchard, holm oak reforestation, holm oak dehesa and sunflower plantation) during the four seasons of one year. In addition, we evaluated the differential response of previously selected EMAs isolates to environmental stresses and the effect of those on their presence, persistence and virulence, in order to obtain useful tools for strain selection with environmental competence.

In chapter II, the presence, diversity and population dynamic of EMAs in soil and phylloplane of five Mediterranean ecosystems with different management degrees were evaluated for one year. A total of 697 EMAs isolates were obtained from 272 soil samples, 1608 crop phylloplane samples and 1368 weed phylloplane samples. The following nine species were identified: *Beauveria amorpha*, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense*, *M. robertsii*, *Paecilomyces marquandii* and *Purpureocillium lilacinum* using elongation factor-1 α (EF-1 α) gene sequences. The species richness, diversity and evenness were calculated for each cropping system, yielding the following species ranking, which was correlated with the crop management intensity: holm oak reforestation > organic olive orchard > conventional olive orchard > holm oak dehesa > sunflower plantation. The ISSR analysis revealed high genotypic diversity among the *B. bassiana* isolates on the neighbourhood scale, and the isolates were clustered according to the habitat. These results suggest that the EMAs in the phylloplane could result from the dispersal of fungal propagules from the soil, their main reservoir, because of wind or insect activity, between others. However, a few *B. bassiana* isolates inhabit only the phylloplane, which suggest that this isolates could be real fungal epiphytes.

In the phylloplane, EMAs are more exposed to environmental stresses than they are in the soil, which may have led to the adaptation to this environment. In chapter III, we have investigated whether *B. bassiana* genotype or isolation habitat, i.e., soil or phylloplane, within the same geographic area influences their responses to key environmental stresses, such as temperature, moisture and UV-B radiation, which can affect their successful use in microbial control. Twenty isolates of *B. bassiana* obtained from the soil and phylloplane in two of five ecosystems sampled in chapter II (holm oak dehesa and a reforested area) were selected to study the population distribution of these isolates and evaluate their thermal, humidity and UV-B requirements. Molecular characterization was conducted by using EF-1 α , the intergenic nuclear region Bloc and 15 microsatellite primers. But relationship was not found between the clades or genotypes and their habitat (soil or phylloplane) of isolation or ecosystem. However, again appeared a genotype that was collected only from phylloplane samples, such as it was mentioned in chapter II, forming a separate group. To investigate the hypothesis put forward, the responses to temperature (germination and colony growth evaluated in the range 15–35° C), water activity (conidia germination evaluated against values of a_w between 1 and 0.862) and UV-B exposure (conidia exposed to 920 or 1200 mW m⁻² for 2, 4 or 6 h) of the soil and phylloplane isolates were evaluated. No associations in terms of isolate-specific genetic or physiological characteristics with isolate habitat, i.e., soil or phylloplane or ecosystem were found. These results did not provide support for the hypothesis that EMAs strains from the phylloplane had evolved to resist unfavorable environmental conditions. However, some isolates showed an important tolerance to

high UV-B stress, consequently these isolates could be well adapted for future use in semi-arid lands. In chapter IV, a new selection of EMAs strains was evaluated to ascertain the *in vitro* response of phylloplane and soil strains of *Metarhizium* sp. to UV-B radiation and the *in vitro* and *in vivo* effects of UV-B radiation on the viability and virulence of a selected *M. brunneum* strain against *C. capitata*. The objective was to evaluate the conidial germination, culturability and colony growth of 18 *Metarhizium* sp. strains from soil and phylloplane of several Mediterranean ecosystems exposed to 1200 mW m⁻² for 2, 4 or 6 hours. All strains showed a significant decrease in germination, colony growth and culturability associated with the exposure time. Germination rates were below 30% and poor conidia recovery rates were obtained as indicated by low culturability and colony growth indexes after 6 hours of exposure. However, none relationship between the species *M. guizhouense*, *M. robertsii* or *M. brunneum* or the isolation habitat (i.e., the soil or the phylloplane) and the effect of UV-B radiation was found. The best adapted strain *M. brunneum* EAMa 01/58-Su, which showed a high tolerance to UV-B inactivation, was subsequently selected to investigate the UV-B related effects on virulence toward *C. capitata* adults. In a first series of bioassays, pure dry conidia were irradiated with 1200 mW m⁻² for 6 hours before or after adult flies were inoculated. The viability and virulence were compared between UV-B-treated (UV-B treatments) and untreated (NO UV-B treatments) conidia. Irradiation of the conidia prior to the flies were inoculated resulted in a significant decrease in mortality. However, when the conidia were irradiated after insect inoculation, the mortality rates was not significant, even though the conidial viability loss were less than 70% in both cases. To evaluate whether the fungal dosage explained this effect, a second series of experiments on the virulence of strain EAMa 01/58-Su was performed. Adult flies were inoculated with five doses in a ten-fold series (1.0×10^4 to 1.0×10^8 conidia ml⁻¹) and then irradiated at 1200 mW m⁻² for 6 hours. Similar LC₅₀ values, 3.8×10^7 and 4.3×10^7 conidia ml⁻¹, were determined for the UV-B and NO UV-B treatments, respectively. Because the dosage did not explain the viability loss and not the virulence, adult flies were treated with 1.0×10^8 conidia ml⁻¹ and then exposed to 1200 mW m⁻² for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 hours, and the relationships among exposure time and conidia viability and fly mortality loss were determined. According to our “logistic 3 parameters” model, the exposure time for adult flies at 1200 mW m⁻² to achieve a 50% reduction in fly mortality was 47.2 hours, which was longer than that of 5.6 hours required for a 50% reduction in conidia viability. Our results revealed the lack of correspondence between conidial viability losses, approximately 85% in conidia irradiated on both Petri plates and insects, and virulence, with a remaining viable number of conidia exceeding the threshold to cause disease.

The results obtained in this Doctoral Thesis provide useful tools and guidance for searching and selection of EMAs strains better adapted to environmental conditions of Mediterranean region and higher environmental competence, aided by the formulation and application method, which are the first limitations for a successful development of bioinsecticides and inclusion in Integrated Pest Management programs.

ABREVIATURAS

ADN = ácido desoxirribonucleico

AL = anonymous locus

AMEs = ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

ANOVA = análisis de la varianza

AST = average survival time

a_w = water activity

Bloc = nuclear intergenic region

CL₅₀ = concentración letal 50

CFUs = colony forming units

DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis

DNA = deoxyribonucleic acid

dNTPs = deoxynucleotides

EF-1 α = elongation factor-1 α

EMAs = entomopathogenic mitosporic ascomycetes

EPPO = European and Mediterranean Plant Protection Organization

-Fil = filoplano

HR = humedad relativa

HSD = honestly significant difference

ISSR = inter-simple sequence repeat (inter-microsatellite)

ITS = internal transcribed spacer

LC₅₀ = letal concentration 50

LSD = least significant difference

LT₅₀ = letal time 50

MA = malta agar

MLGs = multilocus genotype

MP = maximum parsimony

PC = phylloplane crops

PCR = polymerase chain reaction

RFLP = restriction fragment length polymorphism

RH = relative humidity

SCAR = sequence characterized amplified region

SCL = sequence-characterized loci

SNP = single nucleotide polymorphism

SSU = small subunit

SSR = simple sequence repeat (microsatellite)

STS = sequence-tagged sites

-Su = suelo

TAE = tris-acetate-EDTA buffer

TBR = tree bisection reconnection

TL₅₀ = tiempo letal 50

UV = ultraviolet/ultravioleta

W = weeds phylloplane

Capítulo I. Introducción	1
1. Introducción.....	1
1.1. Agricultura sostenible y control biológico de plagas.....	1
1.1.1. Microorganismos entomopatógenos.....	3
2. Los hongos entomopatógenos.....	4
2.1. Clasificación de los hongos entomopatógenos.....	4
2.2. Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos.....	4
3. Presencia natural de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos.....	6
3.1. Presencia de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos en el suelo.....	7
3.2. Presencia de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos en los artrópodos.....	8
3.3. Asociaciones de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos con las plantas.....	8
4. Diversidad genética de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos.....	10
5. Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos.....	11
5.1. Control biológico clásico.....	12
5.2. Control biológico por conservación.....	12
5.3. Control biológico por inoculación.....	12
5.4. Control biológico inundativo.....	12
5.4.1. Factores que influyen en el uso inundativo de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos.....	13
5.4.2. Intensificación y manejo del cultivo.....	13
5.4.3. Factores ecológicos.....	14
5.4.3.1. Bióticos.....	15
5.4.3.2. Abióticos.....	15
5.4.3.2.1. Humedad.....	15
5.4.3.2.2. Temperatura.....	15
5.4.3.2.3. Radiación solar.....	16
5.4.3.2.3.1. La radiación UV-B.....	16
6. <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedeman) (Diptera; Tephritidae).....	18
7. Objetivos de la presente Tesis Doctoral.....	19
8. Referencias.....	20
Capítulo II. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems	33
Capítulo III. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of <i>Beauveria bassiana</i> from two holm oak ecosystems	39
Capítulo IV. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil <i>Metarhizium</i> sp. Strains	45

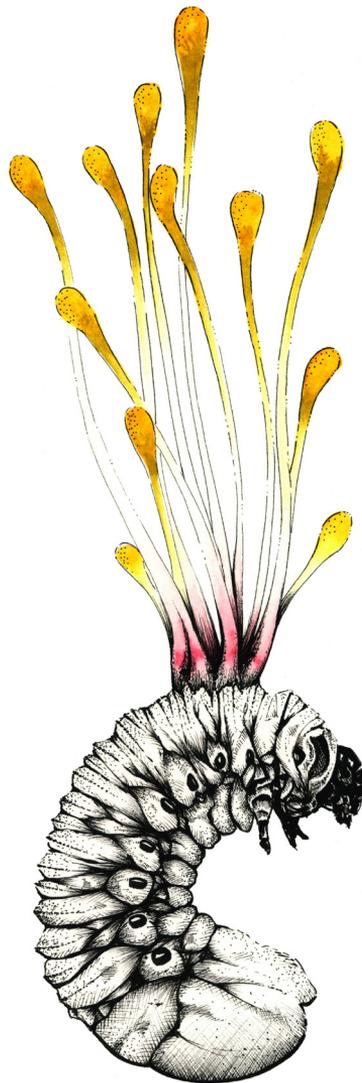
Capítulo V. Discusión general.....	51
Capítulo VI. Conclusiones.....	60
Anexo I.....	65
Anexo II.....	73

Capítulo I. Introducción

- Figura 1. Clasificación de los Hongos Entomopatógenos. Los géneros *Lagenidium* (Oomycetes: Lagenediales) y *Leptolegmia* (Oomycetes: Saprolegniales) pertenecientes a los oomicetos no se incluyen en el reino de los hongos. Esta clasificación se basa en la propuesta de Hibbet et al. (2007), Humber (2012), Gryganskyi et al. (2012; 2013), Wang et al. (2016) y las ARS collection of the entomopathogenic fungal cultures (<http://arself.fpsnl.cornell.edu>)..... 5
- Figura 2. La figura ilustra el modo de acción de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno: (A) Infección: los conidios se adhieren a la cutícula del hospedante y germinan formando un apresorio; (B) Crecimiento: las hifas atraviesan la cutícula y alcanzan el hemocele, donde se desarrollan en forma de micelio y blastosporas, para infectar órganos y tejidos hasta causar la muerte; (C) Reproducción: si las condiciones ambientales son favorables, el hongo culmina el proceso patogénico al utilizar el cadáver para producir nuevos conidióforos y conidios. La ilustración de las diferentes estructuras fúngicas se ha representado a un tamaño relativo mayor que el hospedante para favorecer la comprensión del diagrama..... 6
- Figura 3. Ciclo de vida generalizado y persistencia en el medio ambiente de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos. Tras la muerte del hospedante infectado, el hongo atraviesa de nuevo la cutícula y produce en el exterior conidióforos y conidios asexuales. (1) Los conidios se liberan pasivamente al medio ambiente en el suelo y filoplano de plantas a través del aire, lluvia, otros insectos, etc., para (2) poder infectar nuevos hospedantes. (3) Ocasionalmente, los cadáveres infectados producen cuerpos fructíferos sexuales que producen ascosporas, las cuales se dispersan activamente para (4) infectar nuevos hospedantes. (5 y 7) Los conidios asexuales de algunos taxones pueden colonizar tejidos vegetales vivos en los que el hongo puede (6) establecerse y crecer como endófito o (8) proliferar en la rizosfera. (9 y 10) Presumiblemente, los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos establecidos en las plantas, bien en la rizosfera, o como endófitos, pueden volver a infectar a un hospedante al entrar en contacto con el hongo en la planta o sus proximidades (rizosfera). La ilustración de las diferentes estructuras fúngicas se ha representado a un tamaño relativo mayor que el hospedante para favorecer la comprensión del diagrama..... 7
- Figura 4. Descripción del proceso para la determinación molecular de la diversidad de AMEs. Elaboración propia a partir de Enkerli y Wilmer (2010) y Chauhan et al. (2013)..... 10

Capítulo I:

Introducción



1.- Introducción

La presencia de los insectos en la Tierra se remonta al Ordovícico, hace 480 millones de años, en sincronía con la aparición de las plantas, con las que han coevolucionado de forma prodigiosa (Misof et al., 2014). La fitofagia como estrategia de explotación de recursos alimentarios predomina en la superclase Hexapoda del filo Arthropoda, si bien, los cambios geoclimáticos han promovido una radiación evolutiva con una plétora de mecanismos de adaptación para explotar los recursos vegetales para alimentación y puesta (Rajendran y Sing, 2016). En esta coevolución, las plantas han desarrollado mecanismos defensivos frente a la fitofagia, con base en la producción de sustancias aleloquímicas, mientras que los insectos se han adaptado en esta batalla dentro de la ecología química con mecanismos de detoxificación, que han mantenido el equilibrio entre ambos grupos (Rajendran y Sing, 2016).

Sin embargo, en algún momento de la historia de la humanidad, que posiblemente se repitió en bastantes lugares distintos y de forma independiente, entre 20000 y 10000 años a.C., se comenzó a cultivar algunas especies vegetales comestibles, que antes estaban mezcladas con otras sin utilidad o incluso tóxicas, el hombre dejó de ser nómada y se hizo sedentario, había surgido la Agricultura (Brown et al., 2009). En estos incipientes ecosistemas agrícolas, de naturaleza antropogénica, se alteró el equilibrio entre las cadenas tróficas, con un notable incremento de la capacidad de carga del fitófago sobre la especie cultivada, asociado a una pérdida de diversidad con respecto a los ecosistemas naturales. Los insectos empezaron a competir con los intereses del hombre, aparecieron sus primeras plagas, azote que ha afligido a

la agricultura hasta nuestros días (Rajendran y Sing, 2016).

1.1.- Agricultura sostenible y control biológico de plagas

La producción de alimentos ha sido una de las fuerzas generadoras de nuevas civilizaciones, y a lo largo de los siglos, la población humana se ha incrementado en paralelo a su competencia por los recursos con otros seres vivos, con énfasis en los que atacan a sus cultivos (Sanderson et al., 2002). En la actualidad, el mundo experimenta una demanda creciente de la producción agraria, derivada sobre todo de tres aspectos cruciales, el aumento de la población de la tierra, el mayor consumo de carne, productos lácteos y grano para el ganado, y finalmente, el de biocombustibles (Foley et al., 2011).

La población mundial crece a un ritmo aproximado de 70 millones de habitantes por año, y podría estabilizarse en torno a los 9.200 millones en 2050, lo que requeriría un aumento del 60-70% en la producción agrícola mundial para garantizar la seguridad alimentaria (Godfray et al., 2010; FAO, 2012). La disponibilidad de tierras agrícolas adicionales es limitada, y cualquier expansión podría ocurrir en detrimento de los bosques y de los hábitats naturales que contienen fauna silvestre, diversidad vegetal y artropodofauna útil (Godfray et al., 2010). Además, las tierras agrícolas han comenzado a utilizarse para producir productos básicos de origen biológico, como el biocombustible o la fibra, en lugar de los alimentos (Godfray et al., 2010). En este escenario, irrumpe la amenaza de los efectos del cambio climático y la inquietud sobre su efecto sobre el sistema alimentario. Por tanto, el gran reto mundial, que se asemeja a las Revoluciones

Industriales y Agrícolas de los siglos XVIII y XIX y la Revolución Verde del siglo XX, es la adaptación a la rápida evolución de la demanda de alimentos de una población creciente de manera sostenible desde el punto de vista económico, medioambiental y social (Rajendran, 2013), lo que solo puede conseguirse a la luz de los principios de la Agricultura Sostenible, y de su herramienta, la Producción Agraria Integrada (Conway y Barbier, 2013).

En este contexto, el camino más sostenible para garantizar la seguridad alimentaria debería ser el incremento del rendimiento de los cultivos frente a la opción de incrementar la superficie agraria. Sin embargo, estudios recientes indican que los cuatro principales cultivos mundiales, maíz, arroz, trigo y soja, sólo experimentan mejoras de rendimiento promedio entre 0.9 y 1.6 por ciento al año, muy inferiores al 2.4% anual necesario para responder la demanda de esta población creciente, lo que cuestionaría la seguridad alimentaria en una proyección a 2050 (Ray et al., 2013). De forma complementaria, el aumento de la disponibilidad de alimentos también puede alcanzarse mediante la reducción del daño a los cultivos causado por las plagas de insectos. No obstante, a pesar de aplicar medidas de control de plagas, con un aumento de 15 a 20 veces en el uso de pesticidas químicos en los últimos 40 años, aproximadamente el 10% de la producción agrícola mundial es destruida por plagas de insectos antes de la cosecha, y un 20% adicional debido a las enfermedades y las fanerógamas espontáneas adventicias (Oerke, 2006).

Los insecticidas han constituido una herramienta clave en la protección de cultivos desde la revolución verde hasta la actualidad

(Conway y Barbier, 2013). Sin embargo, su uso creciente y a veces indiscriminado, no ha estado exento de efectos secundarios para el medioambiente y los seres vivos, así como de contaminación en distintos niveles tróficos (Hoppin et al., 2006; Roldan-Tapia et al., 2006; Remor et al., 2009; Pathak et al., 2011; 2013; Fareed et al., 2013). Además, el empleo excesivo y reiterado de estos productos ha comenzado a tener consecuencias indeseables sobre su propia eficacia tales como la aparición de resistencia por parte de los insectos diana, y el problema del resurgimiento de plagas asociado en muchos casos a la misma. En la actualidad, se necesitan aproximadamente 140.000 compuestos insecticidas iniciales para precisar un compuesto que pueda alcanzar el mercado, lo que requiere una inversión de unos 300 millones de euros y 8-12 años (Sparks, 2013). Aun así, y a pesar de esta gran inversión, más de 500 especies de insectos y ácaros han desarrollado resistencia a uno o más insecticidas (Hajek, 2004).

Una de las propuestas clave de la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, así como del Proyecto 21 de la ONU, aprobados en la cumbre de la tierra de Río de Janeiro de 1992 fue la necesidad de implantar medidas correctivas para lograr una agricultura sostenible y la seguridad ambiental, aspecto que se ha refrendado más recientemente en la Cumbre Río+20 en 2012. Sin duda, una de las alternativas más importantes que se identifican es el control biológico mediante el empleo de enemigos naturales entomófagos y entomopatógenos, responsables en su conjunto de un 50-90% de la mortalidad natural que ocurre en las poblaciones de insectos y ácaros (Pimentel, 2005). Sin duda, el control biológico puede

contribuir a minimizar los riesgos asociados al empleo de insecticidas químicos, en particular, residuos en los productos agrícolas, plazos de seguridad, condiciones de reentrada a las explotaciones, aparición de resistencia, protección de la biodiversidad.

1.1.1.- Microorganismos entomopatógenos

El control biológico ha adquirido importancia creciente en el control de plagas y enfermedades tanto en la Producción Integrada como en la Ecológica, pues es imperante reducir o eliminar el uso de los pesticidas convencionales y por tanto sus efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana (Quesada-Moraga et al., 2009). El control biológico de plagas mediante enemigos naturales implica organismos entomófagos vertebrados (pequeños mamíferos, aves) e invertebrados (depredadores, parásitos y parasitoides), así como todos los microorganismos susceptibles de producir enfermedad a los artrópodos como los virus, bacterias, nematodos, protozoos y hongos (Kaya y Vega, 2012; Lacey, 2017).

Los insectos han coevolucionado con los microorganismos desde su aparición, como revela la existencia de fósiles de insectos en ámbar con evidencias de presencia de microorganismos de hasta 200 millones de años de antigüedad (Davidson, 2012). El hombre ha sido testigo privilegiado de esta relación, aunque muchas de las descripciones existentes hasta la aparición del microscopio, nos presentan a un observador preciso pero aún desconocedor del origen de los procesos descritos, como corresponde a las históricas ilustraciones de Réaumur en 1726 y Fray Joseph Torrubia en 1754, con ilustraciones de estados inmaduros y adul-

tos de insectos con crecimiento de estromas de *Cordyceps* y *Torrubiella*, ambos géneros de ascomicetos entomopatógenos (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). A este respecto, han resultado particularmente importantes en el surgimiento de la Patología de Invertebrados las observaciones y estudios realizados con dos insectos de los que el ser humano se ha beneficiado desde hace cientos de años, la abeja melífera y el gusano de seda, cuyas enfermedades han mermado de forma histórica las producciones de miel y seda. Durante el siglo XVIII se producen varias observaciones importantes para la patología de insectos, pues Adam G. Schirach describió el agente que producía el daño que él llamó “loque”, causado por una bacteria a larvas de *Apis mellifera* L. en 1771, a lo que se unen las ya mencionadas ilustraciones de Réaumur y Torrubia. Sin embargo, fue en el siglo XIX, en 1835, cuando Agostino Maria Bassi, considerado el *padre de la patología de insectos*, observó el carácter infeccioso del *mal del segno* o *calcino* del gusano de seda *Bombyx mori* L. cuyo agente causal, *Botrytis bassiana* Balsamo 1835, ahora *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, se transmitía de orugas enfermas a otras sanas por inoculación (Davidson, 2012). Medio siglo más tarde, en 1878, Metchnikoff fue el primero en producir en masa en medio artificial una cepa del ascomiceto mitospórico *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, procedente de *Anisoplia austriaca* Herbst (Coleoptera: Scarabaeidae), para el control de esta especie en tratamientos de suelo en Rusia (Davidson, 2012). Desde entonces, se ha descrito la naturaleza causal (infecciosa) de un gran número de microorganismos entomopatógenos y muchos de ellos han sido desarrollados

para el control microbiano de plagas (Davidson, 2012).

2.- Los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos constituyen un conjunto diverso de especies con diferencias en sus requisitos nutricionales, modo de acción, persistencia y dispersión, pero que comparten su capacidad de infectar a los artrópodos por vía tegumentaria y causarles la muerte (Goettel et al., 2005; Lacey, 2017). Estos agentes fúngicos de control microbiano regulan de forma natural las poblaciones de artrópodos, con los que mantienen una continua coevolución, y de los que obtienen la energía necesaria para su desarrollo, como biotrofos, hemibiotrofos o necrotrofos (Roy et al., 2006; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Estos últimos pueden ser cultivados en medio artificial lo que ha permitido su desarrollo comercial para el control de varios grupos de insectos donde representan la única alternativa, como los insectos picadores chupadores, así como muchos insectos de suelo, e incluso insectos sinantrópicos y de interés médico-veterinario (Faria y Wraight, 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Además, en los últimos años se han descrito nuevas funciones de los hongos entomopatógenos en la naturaleza más allá de la regulación de poblaciones de artrópodos, en particular las relacionadas con sus sorprendentes asociaciones con las plantas, de las que emanan nuevas estrategias no sólo para la protección de cultivos, sino incluso para la producción vegetal (Quesada-Moraga, 2013).

2.1.- Clasificación de los hongos entomopatógenos

Se estima que existen unas 700-750 especies de hongos patógenos de artrópodos en el reino Mycota, si bien este carácter es poco frecuente en las divisiones, Blastocladiomycota y Basidiomycota, más frecuente Ascomycota y único en Entomophthoromycota, una división que solo incluye hongos entomopatógenos (Hibbett et al., 2007; Gryganskyi et al., 2012; 2013; Humber, 2012; Wang et al., 2016) (Fig. 1). En la división Entomophthoromycota se encuentran especies que originan importantes epizootias en las poblaciones naturales de artrópodos, en especial las familias Entomophthoraceae, Neozygita-ceae o Ancylistaceae, pero su condición de biotrofos obligados limita su multiplicación en medio artificial, y por tanto su empleo inundativo (Keller, 2007; Pell et al., 2010; Boomsma et al., 2014). Sin duda, el grupo más importante de hongos entomopatógenos es el de los **ascomicetos mitosporicos entomopatógenos (AMEs)**, integrado por más de 600 especies que infectan insectos y ácaros (Sung, 2008; Chandler, 2017). Las familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae, del orden Hypocreales, y Trichocomaceae, del orden Eurotiales (Fig. 1), han sido las más ampliamente estudiadas, pues su eficacia, su fácil manejo y producción en masa los convierte en una opción excepcional para su comercialización como micoinsecticidas (Pell et al., 2010).

2.2.- Patogénesis de los ascomicetos mitosporicos entomopatógenos

El proceso patogénico de los AME está determinado por tres fases principales: infección, crecimiento y reproducción (Fig. 2) (Boomsma et al., 2014). La fase de infección se inicia con la adhesión de las esporas a la cutícula del insecto hospedante, seguida de

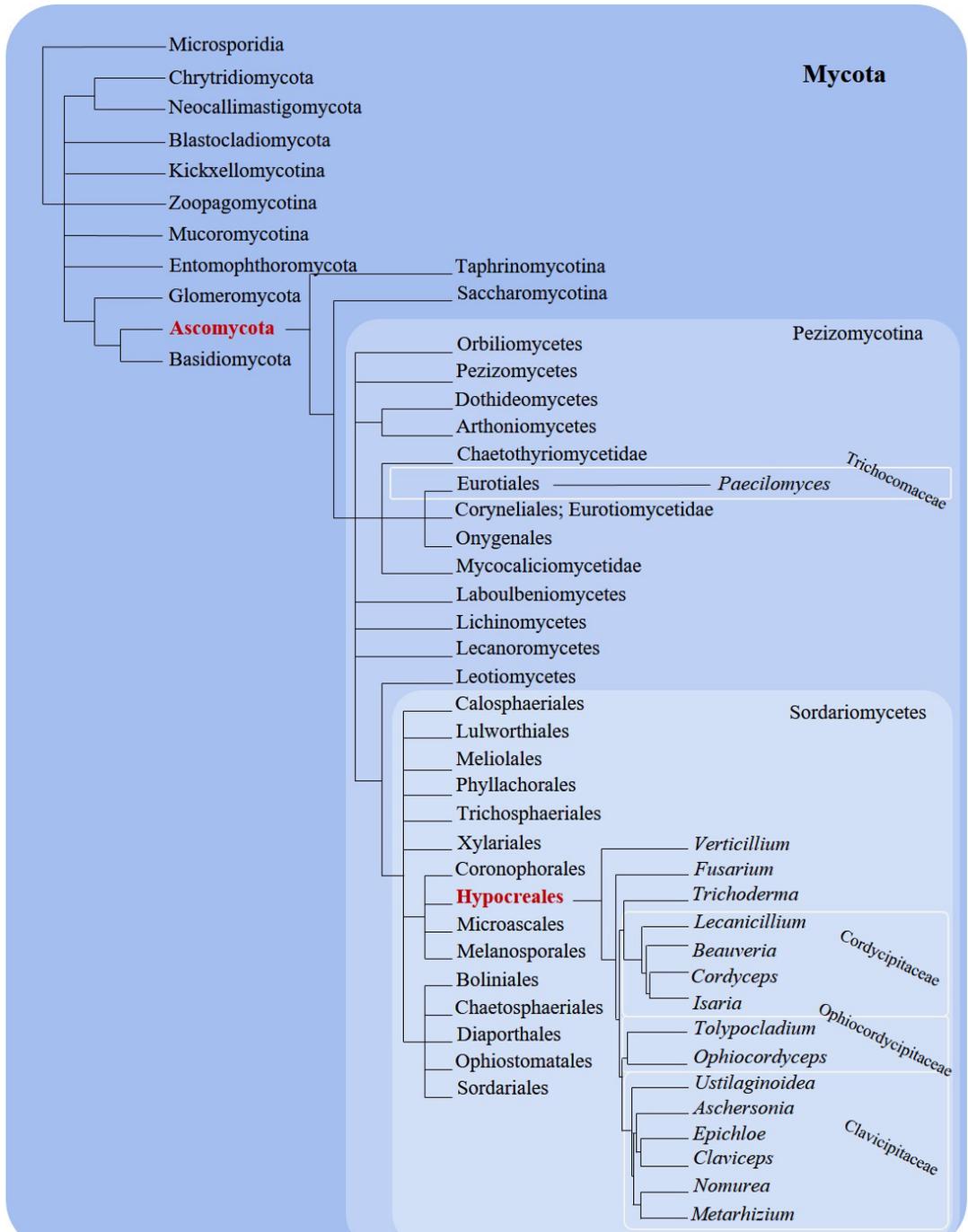


Figura 1. Clasificación de los Hongos Entomopatógenos. Los géneros *Lagenidium* (Oomycetes: Lagenediales) y *Leptolegmia* (Oomycetes: Saprolegniales) pertenecientes a los oomicetos no se incluyen en el reino de los hongos. Esta clasificación se basa en la propuesta de Hibbet et al. (2007), Humber (2012), Gryganskyi et al. (2012; 2013), Wang et al. (2016) y las ARS collection of the entomopathogenic fungal cultures (<http://arseq.fpsnl.cornell.edu>).

la germinación y formación de estructuras de la fase de crecimiento, en la que el hongo de anclaje tipo apresorio (Fig. 2A), antesala penetra la cutícula gracias a la acción con-

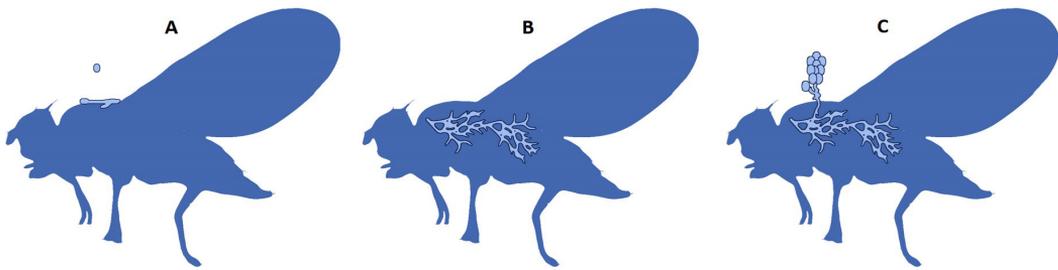


Figura 2. La figura ilustra el modo de acción de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno: (A) Infección: los conidios se adhieren a la cutícula del hospedante y germinan formando un apresorio; (B) Crecimiento: las hifas atraviesan la cutícula y alcanzan el hemocele, donde se desarrollan en forma de micelio y cuerpos hifales, para infectar órganos y tejidos hasta causar la muerte; (C) Reproducción: si las condiciones ambientales son favorables, el hongo culmina el proceso patogénico al utilizar el cadáver para producir nuevos conidióforos y conidios. La ilustración de las diferentes estructuras fúngicas se ha representado a un tamaño relativo mayor que el hospedante para favorecer la comprensión del diagrama.

junta de la presión mecánica y la producción de enzimas, en especial quitinasas y proteasas (Hajek y St. Leger, 1994; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016). Tras la penetración, las estructuras fúngicas (hifas y blastosporas) alcanzan el hemocele, donde deben vencer la respuesta inmunológica celular y humoral del insecto, para infectar sus órganos y tejidos hasta causarle la muerte (Fig. 2B). Si las condiciones microclimáticas son propicias, se inicia la fase de reproducción, donde el hongo culmina la invasión del cadáver y vuelve a atravesar la cutícula para producir en el exterior nuevos conidióforos y conidios que se dispersarán a través del viento, la lluvia o los propios insectos y darán lugar a un nuevo ciclo de infección (Fig. 2C) (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Vega, et al., 2012; Boomsma et al., 2014; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016). No obstante, es de destacar que los ascomicetos entomopatógenos poseen ciclos de vida más complejos que incluyen etapas fuera del insecto hospedante poco estudiadas hasta la fecha, tanto en fase anamórfica o mitospó-

ca (conidios o microesclerocios) como en la fase telomórfica (ascosporas sexuales), que les permiten persistir durante prolongados periodos de tiempo en el suelo o asociados con las plantas a la espera de poder interactuar nuevamente con sus artrópodos hospedantes (Fig. 3).

3.- Presencia natural de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

A pesar de la creencia generalizada de que los dos reservorios de AMEs más importantes son el suelo, considerado el principal, así como las poblaciones de artrópodos hospedantes a las que infectan, varias investigaciones realizadas en el siglo XXI ponen de manifiesto la existencia de **sorprendentes asociaciones de los AMEs con las plantas**, en el **filoplano** (Meyling y Eilenberg, 2006; 2007; Keyser et al., 2015), como **endófitos** (Vega et al., 2009; 2012; Ownley et al., 2010; Quesada-Moraga et al., 2014), o incluso como microorganismos competentes en la **rizosfera** (Hu y St. Leger, 2002), de las que se derivan nuevas aplicaciones en

Agricultura (Quesada-Moraga, 2013), tanto en la respuesta de la planta a otros estreses de tipo biótico, como microorganismos fitopatógenos (Ownley et al., 2008; 2010), y de tipo abiótico, con promoción del crecimiento y mejora de la nutrición mineral (Behie et al. 2012; Sánchez-Rodríguez et al., 2015; 2016) (Fig. 3).

3.1.- Presencia de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos en el suelo

El suelo es probablemente el principal reservorio de los AMEs (Keller y Zimmerman, 1989; Hajek, 1997), con la mayor parte de sus especies presentes en distintas proporciones y concentraciones en suelos naturales y cultivados (Keller et al., 2003; Meyling y Eilenberg, 2006; Quesada-Moraga et al.,

2007). La presencia, diversidad y dinámica poblacional de los AMEs en el suelo está estrechamente relacionada con el grado de manejo de los ecosistemas (Quesada-Moraga et al., 2007). En general, los AMEs perduran en el suelo en forma de conidios, procedentes de cadáveres de artrópodos que padecen la enfermedad en el suelo, o que tras padecerla en la parte aérea, caen al mismo. En el suelo, estos conidios se ven expuestos a diferentes factores que pueden afectar a su presencia y distribución, bióticos, como la presencia de microorganismos antagonistas, o la riqueza y composición de la artrópodo-fauna edáfica, fuente de hospedantes, y abióticos (p.e. temperatura, humedad, radiación UV) y condiciones edáficas, con énfasis en

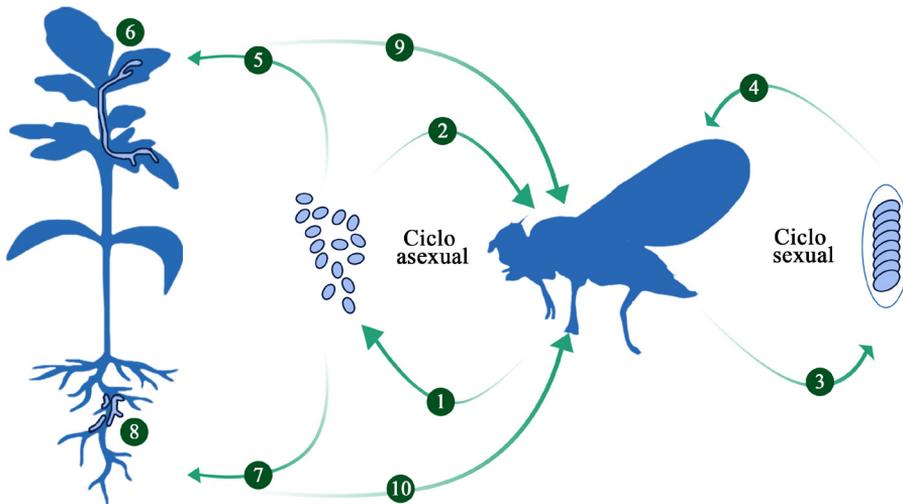


Figura 3. Ciclo de vida generalizado y persistencia en el medio ambiente de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos. Tras la muerte del hospedante infectado, el hongo atraviesa de nuevo la cutícula y produce en el exterior conidióforos y conidios asexuales. (1) Los conidios se liberan pasivamente al medio ambiente en el suelo y filoplanan de plantas a través del aire, lluvia, otros insectos, etc., para (2) poder infectar nuevos hospedantes. (3) Ocasionalmente, los cadáveres infectados producen cuerpos fructíferos sexuales que producen ascosporas, las cuales se dispersan activamente para (4) infectar nuevos hospedantes. (5 y 7) Los conidios asexuales de algunos taxones pueden colonizar tejidos vegetales vivos en los que el hongo puede (6) establecerse y crecer como endófito o (8) proliferar en la rizosfera. (9 y 10) Presumiblemente, los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos establecidos en las plantas, bien en la rizosfera, o como endófitos, pueden volver a infectar a un hospedante al entrar en contacto con el hongo en la planta o sus proximidades (rizosfera). La ilustración de las diferentes estructuras fúngicas se ha representado a un tamaño relativo mayor que el hospedante para favorecer la comprensión del diagrama.

la textura, pH, y contenido de materia orgánica, además de la situación geográfica o el tipo de ecosistema (Quesada-Moraga et al., 2007; Garrido-Jurado et al., 2011a).

3.2.- Presencia de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos en los artrópodos

Los AMEs producen infecciones de forma natural en los artrópodos, principalmente insectos y ácaros. A este respecto, los estudios existentes sobre la presencia natural de AMEs en artrópodos se han centrado principalmente en hospedantes diana u otras especies beneficiosas como depredadores o parasitoides, con pocos estudios dedicados al resto de artropodofauna presente en los ecosistemas (Meyling y Eilenberg, 2007; Garrido-Jurado et al., 2011b).

El desarrollo natural de la enfermedad e incluso su posible dispersión espacial y temporal están sujetas a características de las poblaciones del insecto hospedante (p.e. susceptibilidad, densidad, movimiento y distribución espacial) y del hongo entomopatógeno (p.e. virulencia, poder de dispersión, densidad de inóculo y distribución espacial), así como a factores ambientales (p.e. temperatura, humedad y radiación ultravioleta) y al impacto de la actividad del hombre en los ecosistemas naturales y agroforestales (Quesada-Moraga et al., 2007). Así, *B. bassiana* es capaz de infectar a más de 700 especies de artrópodos mientras otras especies son más específicas de un grupo más reducido como un orden o una familia de insectos o ácaros (Inglis et al. 2001; Lacey, 2017).

Existen diferencias entre entomofloraceos y AMEs en su incidencia natural en las poblaciones de artrópodos, en general, epizoótica en los primeros, enzoótica en los segundos.

En efecto, algunas especies de entomofloraceos originan llamativas y espectaculares epizootias, que tienen marcado impacto en el control natural de las poblaciones de sus hospedantes (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Infectan con preferencia estados inmaduros, ninfas, larvas, pupas, aunque en algunos casos, como por ejemplo en dípteros, el adulto es el estado más comúnmente infectado (Eilenberg, 2002). Sin embargo, existen escasas referencias a epizootias causadas por AMEs (Goettel et al., 2005). Aunque algunas especies originan epizootias, estas no llegan a alcanzar la notoriedad de las originadas por los primeros, con la mayor parte de epizootias descritas en insectos de suelo, geobiontes o geófilos, como gusanos de alambre y gusanos blancos, causadas por *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* (Zimmermann, 1992), sin olvidar las epizootias de *Nomuraea riley* (Farlow) Sanson en *Anticarsia gemmatalis* Hub. en soja (Ignoffo, 1981).

3.3- Asociaciones de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos con las plantas

Hasta bien entrado el siglo XXI, pocos estudios habían examinado la ecología de los AMEs más allá de su presencia en el suelo e interacción con los artrópodos. Sin embargo, el sorprendente descubrimiento en 1990 de la presencia natural de *B. bassiana* como un endófito en maíz y su aplicación en el control de barrenadores del tallo de la graminéa (Bing and Lewis, 1991; Vakili, 1990), impulsó el interés por la ecología de AMEs más allá de la interacción directa con los insectos (Roy et al., 2010), lo que ha ampliado el listado de especies de la flora arvense y cultivadas, herbáceas, arbustivas y leñosas,

colonizadas endofíticamente por AMEs, así como el número de especies fúngicas que presentan esta sorprendente función (Posada y Vega, 2005; Quesada-Moraga et al., 2006; Meyling y Eilemberg, 2007; Quesada-Moraga et al., 2014).

También se ha descubierto la asociación del género *Metarhizium* con la rizosfera de plantas vasculares, espacio que rodea a las raíces, en la cual tienen lugar infinidad de interacciones entre éstas y otros microorganismos (Bais et al., 2006), donde se ha constatado la competencia de esta especie fúngica tanto de forma natural como inducida mediante la inoculación del suelo o semillas con este hongo (Hu y St. Leger, 2002; Keyser et al., 2015). Más allá, se ha demostrado que *M. anisopliae* expresa genes similares cuando crece en los exudados de las raíces de plantas que cuando lo hace sobre un sustrato artificial, si bien, la expresión de los genes cambia cuando el hongo crece sobre la cutícula o hemolinfa de un insecto (Wang et al., 2005), lo que revela el desarrollo por parte de los AMEs de diferentes mecanismos de adaptación para su supervivencia en el medio ambiente, ya sea como patógenos de artrópodos, como endófitos o incluso por su competencia en la rizosfera.

La presencia en el filoplano de los AMEs ha suscitado gran interés en el último lustro pues la gran exposición de esta zona a las condiciones ambientales, en especial la radiación solar, podría limitar la posible presencia epífita de estos agentes fúngicos de control biológico (Meyling y Eilemberg, 2006). De hecho, para algunos autores, el envés de las hojas, con menor exposición a la radiación solar y el lavado de lluvia, parece ser más rico en AMEs (Jaronski, 2010). Otro factor que podría limitar la presencia

de los AMEs en el filoplano es la competencia con otros componentes del microbiota epífita (Stohr y Dighton, 2004). Sin embargo, las características microclimáticas que se crean en las hojas vivas como consecuencia de la transpiración, la presencia de agua libre, la transferencia energética durante el día, e incluso la concentración de solutos provenientes de exudados, podrían favorecer la presencia y actividad patogénica de ciertos hongos en el filoplano, como revela la mayor riqueza relativa de la micoflora del filoplano de hojas jóvenes de *Zygophyllum album L.* respecto a las senescentes (Fahmy y Ouf, 1999).

Aunque existen pocos trabajos hasta la fecha, la presencia de AMEs en el filoplano, con una distribución desigual en función de la altura de la planta, podría responder a su dispersión pasiva por el aire o la lluvia, e incluso sobre el exoesqueleto de insectos no susceptibles (Meyling y Eilemberg, 2006; Howe et al., 2016). Así, *B. bassiana* se ha encontrado de manera natural en el filoplano de especies arvenses en los márgenes de cultivos, así como en olmos y pinos (Doberski y Tribe, 1980; Meyling y Eilenberg, 2006; Ormond et al., 2010), aunque sin presentar una aparente relación con la planta, sólo como componente de la micoflora del filoplano. No obstante, se ha detectado recientemente la presencia del mismo genotipo de *B. bassiana*, en el filoplano y como endófito, lo que apunta a una mayor interacción entre la planta y el AMEs (Fernández-Bravo et al., 2016). **A este respecto, es necesario profundizar en la presencia natural y ecología de AMEs en el filoplano en distintos sistemas agroforestales mediterráneos con distintos grados de manejo e intensificación. Además, se desconoce aún el pa-**

pel que juegan los AMEs en el filoplano de las plantas, así como la naturaleza de su interacción con la planta, aspectos claves de los que podrían derivarse importantes recomendaciones y aplicaciones en protección de cultivos (Meyling y Eilenberg 2007; Bruck, 2009; Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010).

4.- Diversidad genética de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

La diversidad biológica o biodiversidad hace referencia a la amplia variedad de seres vivos en un ecosistema y los patrones naturales que los conforman, todo ello resultado de millones de años de evolución. La irrupción de las herramientas moleculares de diagnóstico de especies fúngicas, complementarias de las morfológicas, ha revolucionado la clasificación y filogenia de los hongos entomopatógenos, como se ha indicado en el apartado 2.1., y sobre todo, los estudios de diversidad, con la aparición continua de nuevas especies en muchos taxones de AMEs (Bickford et al., 2007). Además, las técnicas moleculares han permitido corregir incorrectas asignaciones específicas realizadas con algunos caracteres un tanto ambiguos, y sobre todo, han dado luz a la comprensión sobre los límites del concepto de especie, en especial dentro del género *Beauveria*, con una mayor diversidad que la que trazaban los criterios morfológicos (Glare, 2004).

La determinación de la diversidad genética de AMEs sigue el proceso descrito en la figura 4, que comienza con la realización de la PCR con el ADN de las muestras recogidas, bien directamente o bien tras su cultivo y purificación (Chauhan et al., 2013). En función del tipo de la muestra se amplifican loci

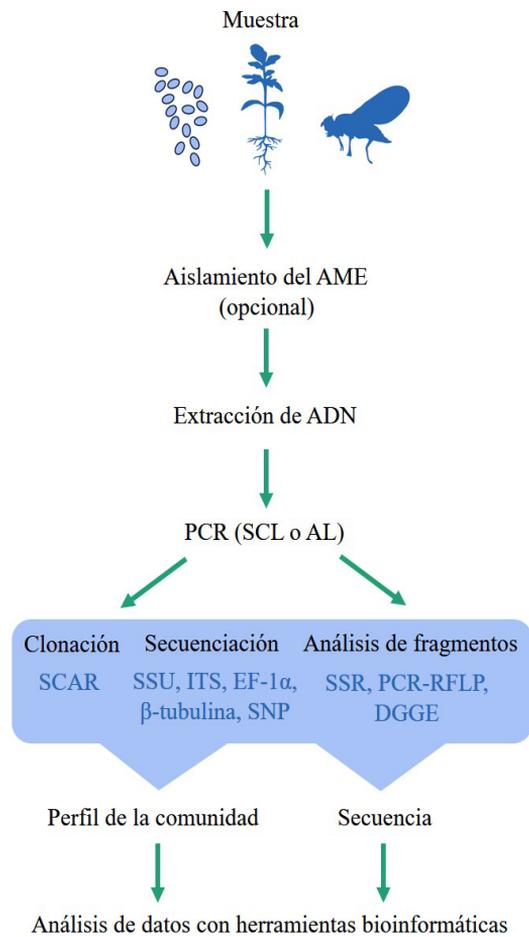


Figura 4. Descripción del proceso para la determinación molecular de la diversidad de AMEs. Elaboración propia a partir de Enkerli y Wilmer (2010) y Chauhan et al. (2013).

caracterizados por secuencias (SCL) a partir de ADN metagenómico o loci anónimos (AL) utilizando cebadores PCR específicos. Los productos de PCR generados se evalúan utilizando diferentes procedimientos analíticos, tales como electroforesis o secuenciación (Enkerli y Wilmer, 2010). Esto permite la detección de características de secuencia específicas con información fundamental para estudios de ecología, que incluyen la identificación de individuos, análisis de estructuras de población de una especie o descripción de comunidades en muestras complejas.

Generalmente las herramientas más utilizadas y que mayor información aportan para explorar la diversidad genética de los seres vivos son los marcadores moleculares, aunque hay que destacar que el ARN y las proteínas también contienen información clave, pues la genómica estructural, la transcriptómica y la proteómica, seguidas de la metabolómica y la interactómica, entre otras, proporcionan un nivel muy alto de comprensión sobre la biología de sistemas (Steinwender et al., 2014).

Las variaciones o mutaciones en el ADN que tienen lugar a lo largo de la evolución, proporcionan una información importantísima para el estudio de las comunidades de AMEs en el medio ambiente ya sea a una escala local o general. De esta forma, el estudio de la dinámica poblacional de AMEs se realiza principalmente mediante el uso de marcadores, bien para la creación de filogenias, bien para el genotipado de los mismos a través de marcadores como microsatélites (SSR), inter-microsatélites (ISSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), sitios etiquetados por la secuencia (STS) o los polimorfismos de nucleótido simple o único (SNP), los cuales presentan un gran potencial para el estudio de poblaciones, pues pueden detectar la variación genética funcional, la cual constituyen el 90% de todas las variaciones genéticas (Enkerli y Widmer, 2010; Steinwender et al., 2014; Mayerhofer, et al., 2015).

Los marcadores genéticos mejor adaptados a estudios de dinámica poblacional de AMEs son los que tienen fundamento en la secuenciación de regiones como los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal, la región factor de elongación 1- α (EF-1 α) y la región intergénica nuclear Bloc,

todos ellos utilizados para la construcción de filogenias (White et al., 1990; Bischoff et al., 2009; Rehner et al., 2011). Por otro lado, los marcadores microsatélites o repeticiones de secuencia única (SSR) proporcionan una herramienta con gran resolución en la distinción de genotipos dentro de una misma especie de AMEs (Enkerli et al., 2005; Oulevey et al., 2009; Enkerli y Widmer, 2010), por lo que la combinación de ambas técnicas se presenta de una forma eficaz para el estudio poblacional de los AMEs. Los genotipos obtenidos en estas herramientas pueden servir como acicate para la elección de cepas que estén mejor adaptadas al medio ambiente y que presenten una mayor patogenicidad y virulencia frente a los artrópodos diana sin efectos sobre la artropofauna auxiliar, información difícil de obtener antes de esta revolución molecular.

Se han aplicado estas herramientas con éxito para comparar poblaciones de hongos entomopatógenos distantes, e incluso del mismo ecosistema (Meyling et al., 2005; 2012), **pero estos marcadores moleculares podrían dar luz sobre la presencia y abundancia relativa de ciertas especies de AMEs en función del grado de manejo del ecosistema o incluso el hábitat, suelo, filoplano de plantas cultivadas, flora arvense, así como de la dinámica local y estacional de sus poblaciones.**

5.- Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Al igual que con otros agentes de control biológico, cuatro son las estrategias que podemos utilizar para el empleo eficiente de los AMEs en el control de las plagas de insectos: (1) Conservación; (2) Clásica; (3) Inoculación e (4) Inundación (Eilenberg et

al., 2001):

5.1.- Control biológico clásico

El control biológico clásico conlleva la introducción de un agente de control para el control de una especie invasora, procedente del área de origen de ésta, con la intención de suprimirla a largo plazo (Lacey, 2017). Existen numerosos ejemplos de control biológico clásico utilizado frente a fitófagos invasivos, principalmente mediante Entomophthorales, como es el caso del control de la “lagarta peluda de los encinares”, *Lymantria dispar* L. a través el hongo *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu and Soper (Hajek et al., 1996; Hajek, 1997).

5.2.- Control biológico por conservación

El control biológico por conservación pretende mantener el medio natural lo más propicio posible para beneficiar al agente de control nativo. Es decir, utilizar las prácticas agronómicas necesarias para favorecer la conservación del agente de control, por ejemplo, reducir el uso de fitosanitarios, contribuir a la disponibilidad de hospedantes susceptibles alternativos, proporcionar una humedad por irrigación apropiada, etc., de manera que se propicien las condiciones necesarias para desencadenar epizootias sobre el fitófago a controlar (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

El correcto desarrollo de esta estrategia requiere el estudio de la presencia natural de AMEs en el en el ecosistema, así como del efecto sobre la misma de las prácticas agrícolas y de las condiciones ambientales (humedad, temperatura, radiación UV, etc.), para detectar tanto los grupos genéticos específicos más adaptados a las mismas, y diseñar las mejores medidas de manejo del

cultivo para favorecer la máxima expresión de su potencial de biocontrol (Fuxa, 1998; Meyling y Eilenberg, 2007).

5.3.- Control biológico por inoculación

Esta estrategia consiste en incrementar la cantidad de inoculo presente en el área, por aplicación a menudo de pequeñas cantidades al inicio de la estación del cultivo, para optar a desencadenar una epizootia que se extienda por un periodo de tiempo y mantenga la población por debajo del umbral de tolerancia. La ilustran dos ejemplos (Shah y Pell, 2003), el ascomiceto mitospórico *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch aplicado contra larvas de gusanos blancos en Europa (Keller et al., 1999) y el empleo combinado de semioquímicos y *Zoophtora radicans* (Befeld) Batko para el control de *Plutella xylostella* L. (Sarfraz et al., 2005).

5.4.- Control biológico inundativo

El control biológico inundativo consiste en la aplicación del agente de control de forma masiva para, de esta manera, reducir las poblaciones del fitófago sin esperar a reinfecciones, en un plazo de tiempo relativamente corto (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Los AMEs, que son necrotrofos, están especialmente adaptados para ser utilizados por inundación, como micoinsecticidas, mediante su producción a gran escala, formulación y aplicación mediante pulverización o espolvoreo, o mediante otras estrategias basadas en el empleo de semioquímicos (Tanada y Kaya, 1993; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

En la actualidad, hay disponibles en el mercado mundial más de 30 micoinsecticidas formulados a base de AMEs como *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Isaria fumosorosea*

y *Lecanicillium* sp., los cuales son utilizados frente a docenas de fitófagos que atacan a una gran variedad de cultivos (Lacey et al., 2015; Lacey, 2017), y que pueden ir dirigidos tanto a ambientes epigeos como hipogeos, mediante pulverización del suelo o el follaje, o acompañadas de cebos o atrayentes que mejoren y aumenten la probabilidad de contacto entre el hongo y el hospedante. En el suelo, al ser su principal hábitat natural de los AMEs y en el que se encuentran protegidos de los factores adversos, es donde ejercen su máximo potencial de biocontrol (Scheepmaker y Butt, 2010). Además, los AMEs pueden permanecer periodos de tiempo prolongados en el suelo, por lo que éste método de aplicación posibilita reducir progresivamente el número de tratamientos tanto en el espacio como en el tiempo (St Leger, 2008; Scheepmaker y Butt, 2010).

5.4.1.- Factores que influyen en el uso inundativo de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Los factores más relevantes que afectan a la eficacia y persistencia de los AMEs en aplicaciones inundativas aéreas son la humedad, la temperatura y en especial la radiación UV (Jaronski, 2010), mientras que las aplicaciones de suelo, son determinantes la textura y el pH del mismo (Garrido-Jurado et al., 2011a). **Es conocido el efecto clave de la formulación para mitigar el efecto de estos factores, pero no menos importante, la selección de aislados con competencia ambiental** (Jackson y O'Callahan, 1997; Jaronski et al., 2010).

5.4.2.-Intensificación y manejo del cultivo

Dentro de los distintos agroecosistemas, los

dedicados a cultivos herbáceos son los más alterados, seguidos de los cultivos leñosos, en especial debido al laboreo y al empleo de fertilizantes y productos fitosanitarios, y ambos distantes de los forestales, más próximos a los ecosistemas menos modificados. Estas alteraciones provocan variaciones no sólo en la densidad del inóculo, sino también en la presencia o ausencia de ciertas especies fúngicas, una variabilidad sobre la que también influye la época del año. Así mismo, el régimen de laboreo influye la cantidad de inóculo en el medio en comparación con suelos poco alterados (Bing y Lewis, 1992).

Ya se ha demostrado la distinta composición de la comunidad de AMEs en zonas cultivadas respecto a las menos perturbadas (Steenberg, 1995; Bidochka et al., 1998; Meyling y Eilenberg, 2006; Quesada-Moraga et al., 2007), así como el efecto diferencial del tipo de laboreo y la siembra directa sobre la presencia y persistencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Hummel et al., 2002). La presencia y persistencia de los AMEs puede estar relacionada con la composición y estructura de la artropofauna, que tiene más refugio en los ecosistemas seminaturales, donde *B. bassiana* presenta una mayor diversidad genética que en ecosistemas agrícolas (Meyling, 2005).

También los productos fitosanitarios pueden tener un efecto en la presencia de AMEs, tanto de forma natural, como después de su aplicación inundativa. A este respecto, se conoce la compatibilidad de algunas materias activas utilizadas en protección de cultivos frente a distintas especies de AMEs, aunque solo en condiciones de laboratorio, con énfasis en los herbicidas, cuyo uso compatible con AMEs ya ha sido demostrado (Klingen

y Haukeland, 2006; Yousef et al., 2015). De mayor complejidad es la interacción de los fungicidas con los AMEs, donde se ha asociado la aplicación del fungicida benomilo con una menor incidencia de *B. bassiana* en el suelo en el Reino Unido (Meitkiewski et al., 1997; Chandler et al., 1998). Por otro lado, cuando se aplica el fungicida triadimefón *in vitro*, se produce una inhibición del crecimiento de *B. bassiana*, pero cuando el fungicida es aplicado en campo, la incidencia de *B. bassiana* es mayor en el suelo que en zonas no tratadas (Meitkiewski et al., 1997; Chandler et al., 1998). Estos resultados enfatizan la importancia de estos trabajos para diseñar estrategias de control integrado de plagas basadas en el empleo conjunto de AMEs con insecticidas, fungicidas y herbicidas.

Se ha propuesto el manejo de las cubiertas vegetales para el empleo de la fauna auxiliar en la dispersión de AMEs (Meyling y Eilemberg, 2007), aunque hay prácticas agrícolas particularmente desfavorables para los AMEs, como el mulching, destinado a retener la humedad y potenciar la humificación del suelo, con un incremento de materia orgánica en el suelo, y por tanto de la actividad antagónica del microbiota edáfico sobre AMEs (Fargues y Robert, 1985; Studdert y Kaya, 1990).

A este respecto, aún permanece sin dilucidar el efecto del grado de alteración y manejo de los ecosistema, naturales o agroforestales, sobre la presencia, diversidad y evolución estacional de AMEs en el suelo y el filoplano de importantes ecosistemas mediterráneos.

5.4.3.- Factores ecológicos

La selección de cepas fúngicas con “com-

petencia ambiental”, adaptadas a las condiciones prevalentes en el ecosistema donde se van a utilizar es una de las alternativas que mayor interés suscita (Jackson y O’Callahan, 1997), por lo que el estudio y comprensión de la dinámica poblacional de los AMEs así como el efecto que ejercen los factores abióticos sobre éstos AMEs son de vital importancia a la hora de establecer modelos predictivos, que permitan un correcto uso de éstos hongos en condiciones adecuadas al ser introducidos en un ecosistema. Sólo así será posible la selección de cepas mejor adaptadas a diferentes condiciones de estrés, aspecto clave para garantizar el empleo eficaz de los AMEs como agentes de control biológico.

El concepto de estrés ambiental ha sido pobremente definido hasta la fecha, lo que implica que cada cambio en las condiciones óptimas podría pertenecer a esta categoría, en un escenario de selección evolutiva (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016). De hecho, los AMEs, al igual que el resto de seres vivos, han evolucionado para adaptarse a las constantes condiciones ambientales cambiantes, con especies que pueden adoptar dentro del mismo hábitat una función dual, la más íntima, como patógenos de artrópodos, pero también en asociación con las plantas (Rangel et al., 2015). A lo largo de las últimas décadas se ha estudiado un gran número de factores estresantes para los AMEs, entre otros, el estrés oxidativo, el osmótico y el estrés ambiental (Rangel et al., 2015).

Pero son sin duda alguna los **factores ambientales** los que provocan un mayor estrés sobre los AMEs, con complejas interacciones entre los factores bióticos y abióticos imperantes sobre su hábitat, que inciden sobre eficacia, ecología y dinámica poblacio-

nal (Jaronski, 2010).

5.4.3.1.- Bióticos

Dentro de los **factores bióticos**, destaca la acción fungistática que pueden ejercer sobre los AMEs algunos microorganismos del suelo, así como los estímulos procedentes del hospedante y del propio suelo, necesarios para la germinación e inicio del proceso patogénico (Grodén y Lockwood, 1991; Jaronski, 2010). La artropodofauna del suelo desempeña un papel importante en la dispersión de los AMEs, y por supuesto, la presencia de artrópodos susceptibles de ser infectados (Meyling y Eilenberg, 2007; Lacey et al., 2015), sin olvidar la interacción que tiene lugar entre los AMEs y las plantas, ya sea como endófitos, epífitos o formando parte de la rizosfera, pues los compuestos químicos propios de dichas plantas pueden afectar al crecimiento y persistencia del hongo en el medio (Cory y Ericsson, 2010).

5.4.3.2.- Abióticos

Los **factores abióticos** como la textura del suelo (entendida ésta como el tamaño del poro y distribución de las partículas), su pH y el manejo del cultivo, lo que incluye la planta hospedante, así como los factores climáticos, son los que más inciden en la presencia y persistencia de los AMEs en el medio ambiente. Dentro de los factores climáticos, la humedad, la temperatura y especialmente la radiación solar (en especial UV-B) son los que limitan de una forma más acentuada el empleo satisfactorio y eficaz de los AMEs. Dedicamos especial atención a los factores climáticos, por ser objetivo prioritario de la presente Tesis Doctoral.

5.4.3.2.1.- Humedad

La humedad necesaria para el desarrollo normal de un AMEs depende, en gran medida, de las condiciones climáticas y microclimáticas de cada hábitat. Se ha demostrado que la capacidad de algunos AMEs para germinar en ambientes con una baja humedad es debido a que existe una humedad suficiente en el microhábitat donde llevan a cabo su actividad (Wraight et al., 2000; Inglis et al., 2001; Fargues et al., 2003). No obstante, la humedad no sólo determina la germinación de conidios, sino también la conidiogénesis tras la muerte del insecto (Inglis et al., 2001). Los conidios necesitan para germinar una humedad relativa (HR) de un 90-95% y una actividad del agua (a_w) de al menos 0,92 en la mayoría de las especies de AMEs (Gillespie y Crawford, 1986).

5.4.3.2.2.- Temperatura

La temperatura es un factor clave para el desarrollo y la actividad de todos los AMEs. La exposición a altas temperaturas puede retrasar o incluso evitar la germinación de los propágulos sobre el insecto (Rangel et al., 2005; Fernandes et al., 2010; Keyser et al., 2014; Alves et al., 2017). El óptimo térmico para la mayoría de los AMEs se sitúa en 25 °C, pero la infección puede ocurrir entre los 15-30 °C. Por lo general, alrededor de los 30 °C el crecimiento vegetativo en la mayoría de los taxones decrece, y normalmente cesa a los 37 °C, lo que limita su proliferación en mamíferos (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). La temperatura interacciona también con la humedad relativa, dando lugar a una gran variabilidad intraespecífica en géneros de AMEs como *Beauveria* y *Metarhizium* (Vidal y Fargues 2007; Garrido-Jurado et al., 2011c; Tseng et al., 2014). Para evitar este tipo de limitacio-

nes, algunos estudios han demostrado que la formulación de los conidios con aceites resulta eficaz frente a temperaturas extremas (Barreto et al., 2016), frente a la baja humedad (McClatchie et al., 1994) e incluso frente a la radiación UV (Moore et al., 1993; Alves et al., 1998). Además, los aceites pueden ayudar a la dispersión y adhesión de los conidios a la cutícula de los artrópodos (David-Henriet et al., 1998).

5.4.3.2.3.- Radiación solar

La radiación solar es sin lugar a duda uno de los factores abióticos más limitantes para la dispersión, presencia y viabilidad de los conidios de AMEs, especialmente cuando se realizan aplicaciones aéreas para el control de fitófagos ectófitos (Fernández et al., 2015). No en vano, la radiación solar es el mayor estímulo que regula los procesos de la mayoría de los seres vivos, incluidos los AMEs, como por ejemplo el fototropismo, el desarrollo sexual/asexual o la producción de metabolitos secundarios (Rodríguez-Romero et al., 2010; Brancini et al., 2016).

La radiación solar ultravioleta (UV) es parte del espectro electromagnético emitido por el sol, que en función de su longitud de onda (λ) se puede dividir en tres tipos de radiación: UV-A (λ entre 315-400 nm), **UV-B (λ entre 285-315 nm)** y UV-C (λ entre 100-285 nm). La radiación UV-C es letal para la vida sobre la tierra, la cual es retenida por completo por la capa de ozono, junto con el 90% de la radiación UV-B. Tan solo un 10% de la radiación UV-B (altamente mutagénica) alcanza la superficie terrestre, junto con el 95% de la UV-A, que también produce daños a los seres vivos, aunque en menor medida (Hockberger, 2002). No obstante, el porcentaje de estas radiaciones aumenta

poco a poco debido al continuo deterioro de la capa de ozono (Mandronich et al., 1998), por lo que su proporción relativa de incidencia sobre la superficie terrestre es cambiante.

5.4.3.2.3.1.- La radiación UV-B

La radiación UV-B se considera un factor abiótico de gran impacto sobre los AMEs, ya que puede causar retraso y la inactivación de los conidios, y por tanto, reducción de la virulencia (Braga et al., 2001). El periodo medio de vida de los conidios de los AMEs bajo luz natural es de 3 a 4 horas en términos de viabilidad (Roberts y Campbell, 1977; Braga et al., 2001), si bien, a periodos más cortos de exposición la inactivación de los conidios no es total, sino que se traduce en un notable retraso en su germinación, aspecto donde existen notables diferencias inter e intraespecíficas (Fargues et al., 1996; Huang y Feng, 2009), e incluso relacionadas con el estado fisiológico y la fase del ciclo celular en que se encuentre el hongo (Braga et al., 2001). Es decir, la exposición de los AME a la radiación UV-B puede inducir retraso en la germinación de los conidios que sobreviven a ella y una reducción de su posterior desarrollo, lo cual se traduce en un detrimento en la persistencia y eficacia de los propágulos infectivos en campo (Fernandes et al., 2015).

Es importante destacar que la fotodegradación que se produce en conidios de AMEs expuestos a la radiación UV-B también puede verse condicionada por la superficie en la que se encuentren, **con la mayor parte de estudios realizados mediante exposición de conidios a UV-B en superficies inertes, tales como portaobjetos de vidrio, medio de cultivo, o incluso superficie de una planta (Inglis et al., 1997), pero muy po-**

cos donde los propágulos sean expuestos a UV-B sobre el propio insecto hospedante, tal y como ocurre en aplicaciones reales de campo. De hecho, bajo condiciones naturales, el escenario es mucho más dinámico, donde los ángulos de incidencia de la radiación UV y su espectro están cambiando constantemente, al igual que los procesos de infección, que actúan también de una forma dinámica (Fargues et al., 1996).

Algunos autores sugieren que la tolerancia a la radiación UV-B podría estar determinada por la adaptación natural de ciertas cepas a diferentes condiciones ambientales dominantes en el entorno o localización geográfica (latitud), entre otros (Fargues et al., 1996; Braga et al., 2001; Fernandes et al., 2007). Dado que no todas las especies o genotipos dentro de una especie presentan la misma respuesta a la radiación UV-B, la tolerancia al estrés podría incrementarse mediante la variación de ciertos parámetros físicos y químicos durante el crecimiento micelial del hongo (Rangel et al., 2015).

Así, el crecimiento de *M. robertsii* en un medio pobre en nutrientes, induce la producción de conidios con una alta tolerancia a la radiación UV-B, en comparación con conidios obtenidos tras la infección y posterior esporulación sobre cadáveres del tenebriónido *Zophobas morio* Fabricius (Rangel et al., 2004). De igual forma, la exposición de micelio de *M. robertsii* durante dos horas a luz azul o UV-A, proporciona conidios más tolerantes a inactivación por la radiación UV-B (Brancini et al., 2016).

Otro tipo de factores que parecen influir en la variación en la susceptibilidad de los AMEs frente a la radiación UV-B son la síntesis de pigmentos. Hongos con pigmentos oscuros o negros resisten mejor la exposición a la

radiación UV-B, un carácter que se pierde cuando se elimina el pigmento mediante la delección del gen responsable de la pigmentación (Ignoffo y García, 1992). Se ha detectado que uno de los pigmentos que confieren tolerancia a la radiación UV es la melanina, un pigmento que no está presente en *Metarhizium* sp., a pesar de que este género produce pigmentos oscuros, lo que limita el rol de la pigmentación en la tolerancia a la radiación UV (Shang et al., 2012). De hecho, estudios realizados por Fargues et al. (1996) señalaron que conidios hialinos como los de *B. bassiana* eran menos susceptibles a la radiación UV-B que los oscuros de *M. anisopliae*. No obstante, en la constante búsqueda de aislados tolerantes a la radiación UV-B, la mira está puesta en la ingeniería genética. Por ejemplo, cepas de *B. bassiana*, especie fúngica que no produce pigmentos visibles, fueron modificadas genéticamente para expresar el aminoácido tirosina, la cual activó la producción de pigmentos que aumentó la tolerancia a la radiación UV de los hongos (Shang et al., 2012). De la misma forma, *M. robertsii* fue modificado genéticamente para que produzca melanina DHN (vía *Alternaria alternata* (Fr) Keissler) lo que incrementó considerablemente su tolerancia a la radiación UV-B (Tseng et al., 2011). Además, se ha propuesto que puede incrementarse la tolerancia a la radiación UV-B en AMEs mediante la sobreexpresión de la enzima fotoliasa que repara el ADN dañado dentro de la célula y que es inducida tras periodos extremos de estrés (Fang y St. Leger, 2012). Aún así, todos estos avances están aún por evaluar en un medio natural, sin olvidar la problemática asociada al empleo de microorganismos transgénicos para el control de plagas.

La radiación UV-B es uno de los principales obstáculos para el uso comercial de los AME, por su efecto inhibitorio sobre su presencia y persistencia, con repercusiones medioambientales y económicas derivadas del incremento del número de tratamientos, por lo que resulta fundamental utilizar todas las estrategias mencionadas para incrementar la tolerancia de los AME a este factor, ya sea mediante su producción en medios pobres en nutrientes que aumentan su tolerancia a la radiación UV (Rangel et al., 2015), mediante el empleo de filtros solares, y por supuesto, mediante la selección de aislados con una alta tolerancia natural a la radiación UV, sin descartar el empleo futuro de cepas mejoradas mediante ingeniería genética. Destacamos la selección de cepas que además de una alta virulencia para el fitófago diana, presenten una mayor tolerancia natural a la inactivación debida a la radiación UV-B (Chelico et al., 2006; Braga et al. 2015; Fernandes et al., 2015; Rangel et al., 2015).

A este respecto, llama la atención la ausencia de estudios sobre el efecto real de la radiación UV-B sobre la virulencia de AME, así como la poca atención dedicada a la búsqueda de cepas de AME particularmente adaptadas a la UV-B por su procedencia, pues desde el punto de vista ecológico, cabe pensar que cepas procedentes de algunos hábitats particulares, como el filoplano, pueden presentar una respuesta diferencial a este crítico factor. Las condiciones ambientales que se dan en el filoplano no parecen a priori favorables para la presencia de AME, por la existencia de marcadas oscilaciones térmicas, poca e intermitente disponibilidad de agua, y sobre todo, exposición a luz so-

lar, con énfasis en la UV-B.

En esta tesis se pretende investigar la presencia y diversidad genética de AME en el suelo y filoplano de cinco sistemas agroforestales mediterráneos que tienen diferentes grados de manejo, como base para evaluar la respuesta diferencial de estos aislados del filoplano a los distintos factores ecológicos. Nuestra hipótesis es que los aislados de AME procedentes del filoplano podrían presentar una mayor resistencia que los de suelo a temperatura, humedad, y en especial, la radiación UV-B, por su exposición natural a este factor, que es el más importante en la inactivación del microbiota foliar (Vidal y Fargues, 2007). También se pretende dilucidar el efecto de la radiación solar sobre la viabilidad y virulencia de los AME tras la exposición de los conidios a UV-B tanto en superficies inertes como sobre el propio insecto hospedante. Para ello, se ha utilizado como modelo un insecto que causa daños muy importantes en la fruticultura mediterránea como es la “mosca mediterránea de la fruta”.

6.- *Ceratitis capitata* (Wiedeman) (Diptera; Tephritidae)

La “mosca mediterránea de la fruta”, *C. capitata*, es originaria de la costa occidental de África (Gasperi et al., 1991), pero ha invadido casi la totalidad de las regiones del Mundo, a lo que han contribuido los intercambios intercontinentales de las producciones frutícolas. La especie puede completar hasta ocho generaciones por año en zonas de clima subtropical, aunque lo más habitual es que no exceda de siete, a expensas, entre otros, de cítricos, frutales de hueso y pepita, caquis e higos (Alfaro-Moreno, 2005).

Las hembras realizan la puesta en la epidermis del fruto, bien en la pulpa, como ocurre en melocotones, bien en la corteza, como en cítricos, donde cada hembra puede llegar a poner hasta 300-400 huevos por término medio, tras cuya eclosión, las larvas ahondan en la pulpa del fruto de la que se alimentan, como grandes responsables del daño y deterioro de los mismos, con pérdidas millonarias incrementadas por la inclusión del tefritido en la lista A2 de la EPPO (Alfaro-Moreno, 2005).

El objetivo que se persigue con la aplicación de medidas para el control de las plagas de *C. capitata* es evitar o reducir de manera muy significativa la puesta, lo que está regulado en España por el Real Decreto 461/2004 de 18 de marzo (BOE 079 de 01/04/2004). Esta normativa incluye un conjunto de medidas fitosanitarias, dirigidas a prevenir el desarrollo de las poblaciones endémicas de la mosca mediterránea de la fruta, tales como el trampeo masivo o medidas culturales o la eliminación de las frutas afectadas. Los tratamientos químicos se realizan por pulverización o mediante el empleo de cebos (Rahman y Broughton, 2016), aunque se recomienda minimizar su empleo por sus efectos secundarios ecológicos y toxicológicos (Arouri et al., 2015, Hsu et al., 2015). Este escenario agudiza la necesidad de nuevas estrategias de control de plagas que se ajusten a los principios de la Agricultura Sostenible, entre las que destaca el control biológico por medio de enemigos naturales entomófagos y entomopatógenos. En particular, los hongos entomopatógenos, que por su modo de acción por contacto, y su contrastada virulencia frente a estados inmaduros y adultos de *C. capitata* (Quesada-Moraga et al., 2006), pueden ser emplea-

dos en diferentes estrategias para el control del temible tefritido tanto en tratamientos de suelo, dirigidos a las larvas cuando caen al mismo para pupar, como en tratamientos aéreos dirigidos a los adultos, mediante pulverización de la parte más soleada del árbol, e incluso mediante el empleo de distintos atrayentes, en dispositivos de atracción e infección (Ekesi et al., 2007; Quesada-Moraga et al., 2008; Yousef et al., 2014).

7.- Objetivos de la presente tesis doctoral

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

- 1.- Describir la presencia, diversidad y dinámica estacional de los AMEs presentes en el suelo y filoplano de plantas leñosas y herbáceas en cinco ecosistemas naturales y agroforestales mediterráneos con diferentes grados de manejo (olivar ecológico, olivar tradicional, plantación de girasol, repoblación de encina y dehesa).
- 2.- Determinar si existen genotipos de *Beauveria bassiana* adaptados al filoplano, como epifitos con base en los obtenidos en los dos encinares del objetivo 1.
- 3.- Evaluar, con base en los aislados de *Beauveria bassiana* de los dos encinares del objetivo 1, la posible respuesta diferencial *in vitro* a la temperatura, actividad del agua y la radiación UV-B de los procedentes del filoplano con respecto a los de suelo en términos de germinación y capacidad de recuperación de conidios.
- 4.- Evaluar, con base en los aislados de tres especies del género *Metarhizium* (*Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense* y *M.*

robertsii), procedentes del objetivo I, la posible respuesta diferencial *in vitro* a la radiación UV-B de los procedentes del filoplaneo con respecto a los del suelo en términos de germinación y capacidad de recuperación

5. Dilucidar *in vitro* e *in vivo* el efecto de la radiación UV-B sobre la virulencia y viabilidad de la cepa EAMa 01/58-Su de *Metarhizium brunneum* sobre adultos de *Ceratitis capitata*.

Los resultados relativos al primer objetivo se recogen en el capítulo II, que comprende el manuscrito “Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems” publicado en la revista *Journal of Invertebrate Pathology* 130 (2015) 97-106. Los resultados de los objetivos dos y tres se recogen en el capítulo III titulado “Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems” publicado en la revista *Journal of Invertebrate Pathology* 141 (2016) 6-17. Los objetivos cuatro y cinco quedan recogidos en el capítulo IV titulado “UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. strains”, el cual fue enviado a la revista *Journal of Invertebrate Pathology* el 1 de febrero de 2017 y en este momento se encuentra en estado de revisión.

8.-Referencias

- Alfaro-Moreno, A., 2005. Entomología Agraria. Los parásitos animales de las plantas cultivadas. Diputación de Soria, Soria, España, pp 219-221
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., Leather, S. R., 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection* 17: 675-679
- Alves, F. M., Bernardo, C. C., Paixao, F. R. S., Barreto, L. P., Luz, C., Humber, R. A., Fernandes, E. K. K., 2017. Heat stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (*in vitro*) and virulence (*in vivo*) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitology Research* 116: 111-121
- Arouri, R., Le Goff, G., Hemden, H., Navarro-Llopis, V., M'saad, M., Castanera, P., Feyereisen, R., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F., 2015. Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. *Pest Management Science* 71: 1281-1291
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266
- Barreto, L. P., Luz, C., Mascarin, G. M., Roberts, D. W., Arruda, W., Fernandes, E. K. K., 2016. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. *Journal of Invertebrate Pathology* 138: 94-103
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., Bidochka, M. J., 2012. Endophytic insect parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576-1577

- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148-155
- Bidochka, M. J., Kasperski, J. E., Wild, G. A. M., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near northern habitats. *Canadian Journal of Botany* 76: 1198-1204
- Bing, L. A., Lewis, L. C., 1991. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology* 20: 1207-1211
- Bing, L. A., Lewis, L. C., 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* 2: 39-47
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512-530
- Boomsma, J. J., Jensen, B., Meyling, N. V., Eilenberg, J., 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology* 59: 467-485
- Braga, G. U. L., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W., 2001. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 105: 874-882
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Fernandes, E. K. K., Flint, S. D., Roberts, D. W., 2015. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics* 61: 405-425
- Brancini, G. T. P., Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., 2016. Exposure of *Metarhizium acridum* mycelium to light induces tolerance to UV-B radiation. *FEMS Microbiology Letters* 363: fnw036
- Brown, T. A., Jones, M. K., Powell, W., Allaby, R. G., 2009. The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 103-109
- Bruck, D. J., 2009. Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and *in vitro*. *Biocontrol* 54: 597-606
- Chandler, D., 2017. Basic and applied research on entomopathogenic fungi. En: Lacey, L. (Eds.), *Microbial control of insect and mite pests*. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp 69-89
- Chandler, D., Mietkiewski, R. T., Davidson, G., Pell, J. K., Smits, P. H., 1998. Impact of habitat type and pesticide application on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in UK soils. *IOBC-SROP Bulletin* 21: 81-84
- Chauhan, P. S., Chaudhry V., Mishra, S., Mishra, A., Nautiyal, C. S., 2013. Unraveling the Shed of Unexplored Rhizosphere Microbial Diversity En: de Burjin, F. J. (Eds.), *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, Volume 1, First Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Chelico, L., Haughian, J. L., Khachatourians, G. G., 2006. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the

- entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *B. nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, and *Verticillium lecanii*. *Journal of Applied Microbiology* 100: 964-972
- Conway, J. R., Barbier, E. B., 2013. After the Green Revolution: Sustainable Agriculture for Development. Earthscan. London-Sterling VA. pp 210
- Cory, J. S., Ericsson, J. D., 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *Biocontrol* 55: 75-88
- David-Henriet, A., Pye, B., Butt, T., 1998. Formulation and application of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of crucifer pests in Europe. *IOBC-WPRS Bulletin* 21: 89-90
- Davidson, E. W., 2012. History of insect pathology. En: Vega, F. E., Kaya, H. K. (Eds.), *Insect pathology*. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp 13-28
- Doberski, J. W., Tribe, H. T., 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 95-100
- Eilenberg, J., 2002. Biology of fungi from the order Entomophthorales. DSc thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46: 387-400
- Ekesi, S., Dimbi, S., Maniania, N. K., 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. En: Ekesi, S., Maniania, N. K. (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management*. Research SignPost, Kerala, pp 239-274
- Enkerli, J., Kolliker, R., Keller, S., Widmer, F., 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Molecular Ecology Notes* 5: 384-386
- Enkerli, J., Widmer, F., 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *Biocontrol* 55: 17-37
- Fahmy, G. M., Ouf, S. A., 1999. Significance of microclimate on phylloplane mycoflora of green and senescing leaves of *Zygophyllum album* L. *Journal of Arid Environments* 41: 257-276
- Fang, W. G., St Leger, R. J., 2012. Enhanced UV Resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *Plos One* 7: e43069
- FAO WFP, IFAD 2012. The state of food security in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. Rome, FAO
- Fareed, M., Pathak, M. K., Bihari, V., Kamal, R., Srivastava, A. K., Kesavachandran, C. N., 2013. Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. *Plos One* 8: e69755
- Fargues, J., Goettle, M. S., Smits, N., Oue-

- draogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., Lomer, C. J., Rougier, M., 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia* 133: 171-181
- Fargues, J., Robert, P. H., 1985. Persistence of conidia of 4 entomopathogenic Hyphomycetes in soil, *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor, *Nomuraea rileyi* (F) Samson and *Paecilomyces fumosoroseus* Wize, in controlled conditions. *Agronomie* 5: 73-80
- Fargues, J., Vidal, C., Smits, N., Rougier, M., Boulard, T., Mermier, M., Nicot, P., Reich, P., Jeannequin, B., Ridray, G., Lagier, J., 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera : Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological Control* 28: 320-331
- Faria, M. R., Wraight, S. P., 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256
- Fernandes, E. K. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E. N., Miller, M. P., Roberts, D. W., 2010. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Entomology* 108: 115-128
- Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Roberts, D. W., 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427-440
- Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, A. M. L., Bittencourt, V., Roberts, D. W., 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 237-243
- Fernandez-Bravo M., Mayerhofer, J., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., Enkerli, J., 2016. Genetic structure of *Beauveria bassiana* in different habitats of a holm oak tree. 49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control pp 108
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S. Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D. P. M., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342
- Fuxa, J.R., 1998. Environmental manipulation for microbial control of insects. En: Barbosa, P. (Eds.), *Conservation biological control*. Academic Press, London, UK, pp 255-268
- Garrido-Jurado, I., Torrent, J., Barrón, V., Corpas, A., Quesada-Moraga, E., 2011a. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58: 277-285
- Garrido-Jurado, I., Ruano, F., Campos, M., Quesada-Moraga, E., 2011b. Effects of soil treatments with entomopatho-

- genic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biological Control* 59: 239-244
- Garrido-Jurado, I., Valverde-García, P., Quesada-Moraga, E., 2011c. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Biological Control* 59: 366-372
- Gasperi, G., Guglielmino, C. R., Malacrida, A. R., Milani, R., 1991. Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.) (medfly). *Heredity* 67:347-356
- Gillespie, A. T., Crawford, E., 1986. Effect of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. and *Verticillium lecanii*. En: Samson, R. A., Vlaskovits, J. M., Peters, D. (Eds.), *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*, Wageningen. Society of Invertebrate Pathology, pp 254
- Glare, T. R., 2004. Molecular characterisation in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. *Laimburg Journal* 1: 286-298
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., Toulmin, C., 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327: 812-818
- Goettel, C., Eilenberg, J., Glare, T., 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. En: L.B., Gilbert, K. L. (Eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier Pergamon, Oxford, UK, pp 361-406
- Groden, E., Lockwood, J. L., 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, in Michigan and Rhode Island soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 7-16
- Gryganskyi, A. P., Humber, R. A., Smith, M. E., Miadlikovska, J., Wu, S., Voigt, K., Walther, G., Anishchenko, I. M., Vilgalys, R., 2012. Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 682-694
- Gryganskyi, A. P., Humber, R. A., Smith, M. E., Hodge, K., Huang, B., Voigt, K., Vilgalys, R., 2013. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia* 30: 94-105
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology* 15: 193-249
- Hajek, A. E., 2004. *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 378
- Hajek, A. E., Elkinton, J. S., Witcosky, J. J., 1996. Introduction and spread of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) along the leading edge of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) spread. *Environmental Entomology* 25: 1235-1247
- Hajek, A. E., St. Leger, R. J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson,

- O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibbell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547
- Hockberger, P. E., 2002. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemical Photobiology* 76: 561-579
- Hoppin, J. A., Umbach, D. M., London, S. J., Lynch, C. F., Alavanja, M. C. R., Sandler, D. P., 2006. Pesticides associated with wheeze among commercial pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology* 163: 1129-1137
- Howe, A. G., Ravn, H. P., Jensen, A. B., Meyling, N. V., 2016. Spatial and taxonomical overlap of fungi on phylloplanes and invasive alien ladybirds with fungal infections in tree crowns of urban green spaces. *FEMS Microbiology Ecology* 92: fiw143
- Hsu, J. C., Huang, L. H., Feng, H. T., Su, W. Y., 2015. Do organophosphate-based traps reduce control efficiency of resistant tephritid flies?. *Journal of Pest Science* 88: 181-190
- Hu, G., St. Leger, J., 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6383-6387
- Huang, B. F., Feng, M. G., 2009. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathologia* 168: 145-152
- Humber, R. A., 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon* 120: 477-492
- Hummel, R. L., Walgenbach, J. F., Hoyt, G. D., Kennedy, G. G., 2002. Effects of production system on vegetable arthropods and their natural enemies. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 165-176
- Inglis, G. D., Goettel M. S., Butt T., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insects pest. En: Butt, T. M., Jackson, C. W., Magan, N. (Eds.), *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. CABI publishing, Wallingford, UK, pp 23-70
- Inglis, G. D., Johnson, D. L., Goettel, M. S., 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of

- grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology* 26: 400-409
- Ignoffo, C., 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. En: Burges, H. (Eds.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London, UK, pp 513-538
- Ignoffo, C. M., Garcia, C., 1992. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environmental Entomology* 21: 913-917
- Jackson, T. A., O'Callahan, M., 1997. Environmental competence an essential characteristic of successful microbial control agents for soil dwelling pests. En: Allsopp, P. G. (Eds.), *Soil Invertebrates in 1997*, Brisbane, pp 74-77.
- Jaronski, S. T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55: 159-185
- Kaya, H. K., Vega, F. E., 2012. Scope and basic principles of insect pathology. En Vega, F. E., Kaya H. K. (Eds.), *Insect pathology*. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp 1-11
- Keller, S., 2007. Arthropod-pathogenic Entomophthorales from Switzerland. III. First additions. *Sydowia* 59: 75-113
- Keller, S., Kessler, P., Schweizer, C., 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol* 48, 307-319.
- Keller, S., Schweizer, C., Shah, P., 1999. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 9: 441-446
- Keller, S., Zimmerman, G., 1989. Mycopathogens of soil insects. En: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.), *Insect-fungus interactions*. Academic Press, London, UK, pp 240-270
- Keyser, C. A., De Fine Licht, H. H., Steinwender, B. M., Meyling, N. V., 2015. Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated with agricultural crops in Denmark. *BMC Microbiology* 30: 15-249
- Keyser, C. A., Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E. N., Roberts, D. W., 2014. Heat induced post stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy?. *Journal of Invertebrate Pathology* 120: 67-73
- Klingen, I., Haukeland, S., 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En: Eilenberg, J., Hokkanen, H. M. T. (Eds.), *An ecological and societal approach to biological control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 145-211
- Lacey, L. A., 2017. Entomopathogens used as microbial control agents. En: Lacey, L. (Eds.), *Microbial control of insect and mite pests*. Academic Press, Yakima, WA, USA, pp 3-12
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1-41

- Mandronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O., Caldwell, M. M., 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 5-9
- Mayerhofer, J., Lutz, A., Widmer, F., Rehner, S. A., Leuchtman, A., Enkerli, J., 2015. Multiplexed microsatellite markers for seven *Metarhizium* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 132-134
- McClatchie, G., Moore, D., Bateman, R., Prior, C., 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycological Research* 98: 749-756
- Mietkiewski, R. T., Pell, J. K., Clark, S. J., 1997. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. *Biocontrol Science and Technology* 7: 565-575
- Meyling, N. V., 2005. Population ecology and genetic diversity of entomopathogenic fungi (Ascomycota: Hypocreales) in agroecosystems and field margins. PhD thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark
- Meyling N.V., Eilenberg J., 2006. Isolation and characterization of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research* 110: 188-195
- Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-55
- Meyling, N. V., Pilz, C., Keller, S., Widmer, F., Enkerli, J., 2012. Diversity of *Beauveria* spp. isolates from pollen beetles *Meligethes aeneus* in Switzerland. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 76-82
- Meyling, N. V., Rehner, S. A., Lubeck, M., Buckley, E. P., Eilenberg, J., 2005. Multiple genetic lineages coexist sympatrically within a local population of *Beauveria bassiana* s.l. 38th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control pp 61
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P. B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R. G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A. J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, T. R., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermiin, L. S., Kawahara, A. Y., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch, H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, D. D., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, J. L., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Pohl, H., von Reumont, B. M., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, N. U., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walz, M. G., Wiegmann, B. M., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, T. K. F., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang,

- S., Yang, Q., Yeates, D. K., Yoshizawa, K., Zhang, Q., Zhang, R., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, C., Zhou, L., Ziesmann, T., Zou, S., Li, Y., Xu, X., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Kjer, K. M., Zhou, X., 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346: 763-767
- Moore, D., Bridge, P., Higgins, P., Bateman, R., Prior, C., 1993. Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 122: 605-616
- Oerke, E. C., 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144: 31-43
- Ormond, E. L., Thomas, A. P. M., Pugh, P. J. A., 2010. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 146-54
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N. O., 2016. Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. En: B. Lovett B., St Leger R. J. (Eds.), *Genetics and molecular biology of entomopathogenic fungi*, Academic Press, San Diego, USA, pp 165-249
- Oulevey, C., Widmer, F., Kolliker, R., Enkerli, J., 2009. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological Research* 113:1016-1024
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., Pereira, R. M., 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 267-270
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., Vega, F. E., 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55: 113-128
- Pathak, M. K., Fareed, M., Bihari, V., Mathur, N., Srivastava, A. K., Kuddus, M., Nair, K. C., 2011. Cholinesterase levels and morbidity in pesticide sprayers in North India. *Occupational Medicine Oxford* 61: 512-514
- Pathak, M. K., Fareed, M., Srivastava, A. K., Pangtey, B. S., Bihari, V., Kuddus, M., Kesavachandran, C., 2013. Seasonal variations in cholinesterase activity, nerve conduction velocity and lung function among sprayers exposed to mixture of pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 7296-7300
- Pell, J. K., Hannam, J. J., Steinkraus, D. C., 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55: 187-198
- Pimentel, D., 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability* 7: 229-252
- Posada, F., Vega, F.E., 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* 97: 1195-1200
- Quesada-Moraga, E., 2013. Tendencias en sanidad vegetal. Nuevas y sorprendentes aplicaciones de los hongos entomo-

- patógenos en sanidad vegetal. *Phytoma*, España 250: 72-73
- Quesada-Moraga E., Navas-Cortés J. A., Maranhao E. A., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Álvarez C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and agricultural soils. *Mycological Research* 111: 947-966
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A. Santiago-Álvarez, C., 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1955-1966
- Quesada-Moraga E., Santiago-Álvarez C., 2008. Hongos Entomopatógenos. En: Urbaneja, A., Jacas, J. (Eds.), Control biológico de plagas. *Phytoma y Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra*, Navarra, España, pp 98-120
- Quesada-Moraga, E., Campos-Aranda, M., Santiago-Álvarez, C., 2009. Control de plagas. En: Junta de Andalucía (Eds.), Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía, Junta de Andalucía, Córdoba, España, pp 189-225
- Quesada-Moraga, E., Herrero-Asensio, N., Zabalgoceazcoa, I., 2014. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. En: Verma, V. C., Gange, A. C. (Eds.), *Advances in endophytic research*, Springer, India, pp 454
- Rahman, T., Broughton, S., 2016. Suppressing Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with an attract-and-kill device in pome and stone fruit orchards in Western Australia. *Crop Protection* 80: 108-117
- Rajendran, T. P., 2013. 50 years after Silent Spring: looking backwards and forwards. En: Shetty, P. K., Ayyappan, S., Swaminathan, M. S. (Eds.), *Climate change and sustainable food security*. National Institute of Advanced Studies, IISC, Bangalore, pp 313-320
- Rajendran, T. P., Sing, D., 2106. Insects and Pest. En: Omkar (Eds.), *Ecofriendly pest management for food security*. Academic Press, London, Uk, pp 1-24
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W., 2004. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 55-58
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W., 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology* 88: 116-125
- Rangel D. E. N., Alder-Rangel, A., Dada-chova, E., Finlay, R. D., Dijksterhuis M. K. J., Braga, G. U. L., Corrochano, L. M., Hallsworth, J. E., 2015. Fungal stress biology: a preface to the Fungal Stress Responses special edition. *Current Genetics* 61: 231-238
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., Foley, J. A., 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *Plos One* 8: e66428
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsaard, J. J., Devotto, L., Humber, R. A., 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055-1073

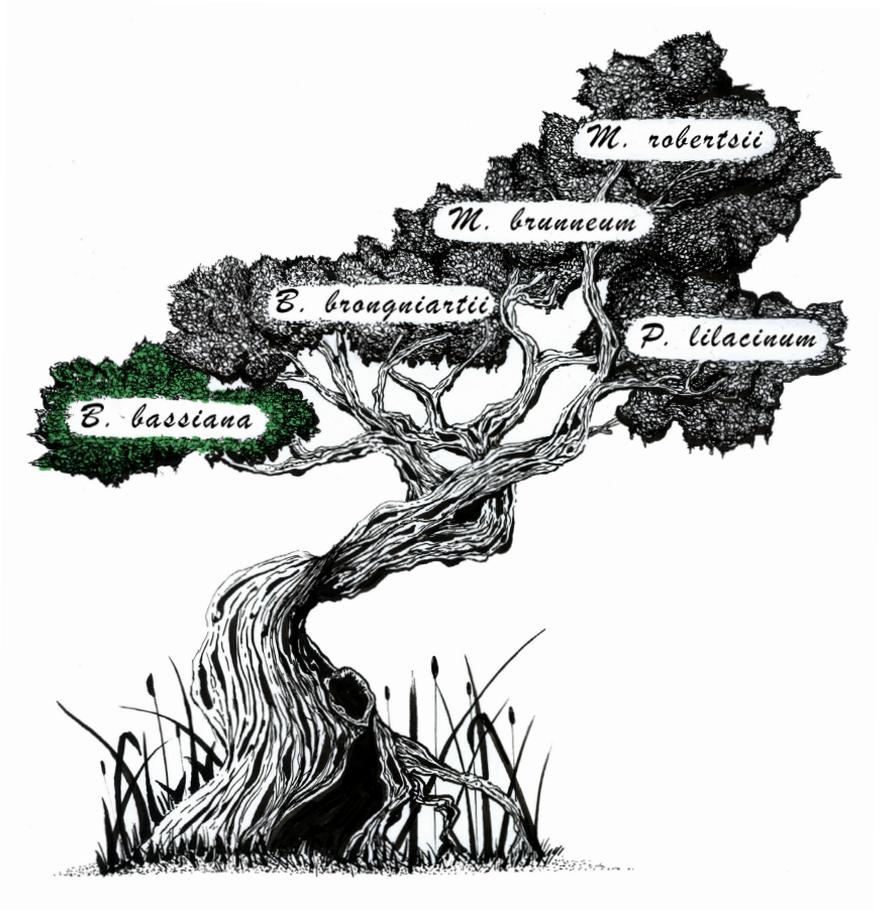
- Remor, A. P., Totti, C. C., Moreira, D. A., Dutra, G. P., Heuser, V. D., Boeira, J. M., 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environmental International* 35: 273-278
- Roberts, D. W., Campbell, A. S., 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 10: 19-76
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S., Fischer, R., 2010. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Review of Microbiology* 64: 585-610
- Roldan-Tapia, L., Nieto-Escamez, F. A., Aguila, E. M., Laynez, F., Parron, T., Sanchez-Santed, F., 2006. Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides. *Neurotoxicology and Teratology* 28: 694-703
- Roy, H. E., Brodie, E. L., Chandler, D., Goettel, M. S., Pell, J. K., Wajnberg, E., Vega, F. E., 2010. Deep space and hidden depths: Understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55: 1-6
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., Pell, J. K., 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology* 51: 331-357
- Sarfraz, M., Keddie, A. B., Dossall, L. M., 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Science and Technology* 15: 763-789
- Sánchez-Rodríguez, A. R., Del Campillo, M. C., Quesada-Moraga, E., 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Scientia Horticulturae* 197: 193-202
- Sánchez-Rodríguez, A. R., Barrón, V., del Campillo, M. C., Quesada-Moraga, E., 2016. The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: a tool for alleviating Fe chlorosis. *Plant and Soil* 406: 295-310
- Sanderson, E. W., Jaileh, M., Levy, M. A., Redford, K. H., Wannebo, A. V., Woolmer, G., 2002. The human footprint and the last of the wild. *Bioscience* 52: 891-904
- Scheepmaker, J. W. A., Butt, T. M., 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology* 20: 503-552
- Shah, P. A., Pell, J. K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413-423
- Shang, Y., Duan, Z., Huang, W., Gao, Q., Wang, C., 2012. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 105-109
- Sparks, T. C., 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 8-17
- St Leger, R. J., 2008. Studies on adaptation of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*

- 98: 271-276
- Steenberg, T., 1995. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to *Sitona* species and other insects in Lucerne. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark
- Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg J., Thorup-Kristensen, K., Meyling, N. V., 2014. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology* 123: 6-12
- Stohr, S. N., Dighton, J., 2004. Effects of species diversity on establishment and coexistence: a phylloplane fungal community model system. *Microbial Ecology* 48: 431-438
- Studdert, J. P., Kaya, H. K., 1990. Water potential, temperature, and claycoating of *Beauveria bassiana* conidia effect on *Spodoptera exigua* pupal mortality in 2 soil types. *Journal of Invertebrate Pathology* 56: 327-336
- Sung, G. H., Poinar, G. O., Spatafora, J. W., 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 495-502
- Tanada, Y., Kaya, H. K., 1993. *Insect pathology*. Academic Press, San Diego
- Tseng, M. N., Chung, P. C., Tzean, S. S., 2011. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4508-4519
- Tseng, M. N., Chung, C. L., Tzean, S. S., 2014. Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. *Plos One* 9: e90473
- Vakili, N.G., 1990. Biocontrol of stalk rot in corn. Proceedings of the 44th Annual Corn and Sorghum Research Conference, Chicago, IL, Dec. 1989. American Seed Trade Association, Washington, DC
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzon, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., Roy, H. E., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Llungsa-Ard, J. J., Blackwell, M., 2012. Fungal entomopathogenics. En: Vega, F. E., Laya, H. K. (Eds.), *Insect pathology, segunda edición*, Academic Press, San Diego, USA, pp 171-220
- Vidal, C., Fargues, J., 2007. Climatic constraints for mycoinsecticides. En: Maniana, K., Ekesi, S. (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management*, Research Sign Posts, Trivandrum, India
- Wang, C. S., Hu, G., St. Leger, R. J., 2005. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 42: 704-718
- Wang, J. B., St. Leger, R. J., Wang, C., 2016. Advances in genomics of entomopathogenic Fungi. *Advances in Genetics* 94: 67-105

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds.), A guide to methods and applications PCR protocols. Academic Press, San Diego, California, pp 315-322
- Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Jaronski, S. T., Bradley, C. A., Garza, C. J., Galaini-Wraight, S., 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203-217
- Yousef, M., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., 2014. One *Metarhizium brunneum* strain, two uses to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Biological and Microbial Control 107: 1736-1744
- Yousef, M., Quesada-Moraga, E., Garrido-Jurado, I., 2015. Compatibility of herbicides used in olive orchards with a *Metarhizium brunneum* strain used for the control of preimaginal stages of tephritids in the soil. Journal of Pests Science 88: 605-612
- Zimmermann, G., 1992. Use of the fungus, *Beauveria brongniartii*, for the control of European cockchafers, *Melolontha* spp. in Europe. En: Jackson, T. A., Glare, T. R. (Eds.), Use of pathogens in scarab pest management. Intercept Limited, Hampshire, UK, pp 199-208

Capitulo II:

Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems



Este capítulo es una versión adaptada del artículo

Journal of Invertebrate Pathology 130 (2015) 97–106



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems



Inmaculada Garrido-Jurado¹, María Fernández-Bravo¹, Carlos Campos, Enrique Quesada-Moraga*

Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio C4 Celestino Mutis, 14071 Cordoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2014
Revised 11 May 2015
Accepted 24 June 2015
Available online 3 July 2015

Keywords:

EF-1 α gene
ISSR
Ecology
Entomopathogenic fungi
Hypocreales

ABSTRACT

The diversity of entomopathogenic Hypocreales from the soil and phylloplanes in five Mediterranean cropping systems with different degrees of management [organic olive orchard conventional olive orchard, holm oak reforestation, holm oak dehesa (a multifunctional agro-sylvo-pastoral system), and sunflower plantation] was studied during four seasons. A total of 697 entomopathogenic fungal isolates were obtained from 272 soil samples, 1608 crop phylloplane samples and 1368 weed phylloplane samples. The following nine species were identified: *Beauveria amorphia*, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *Metarhizium brunneum*, *M. guizhoense*, *M. robertsii*, *Paecilomyces marquandii* and *Illicium* using EF-1 α gene sequences. All the fungal entomopathogenic species were found in both the soil and phylloplane samples, with the exception of *M. robertsii*, which was only isolated from the soil. The species richness, diversity (Shannon–Wiener index) and evenness (Pielou index) were calculated for each cropping system, yielding the following species ranking, which was correlated with the crop management intensity: holm oak reforestation > organic olive orchard > conventional olive orchard > holm oak dehesa > sunflower plantation. The number of fungal species isolated was similar in both phylloplane habitats and dissimilar between the soil and the crop phylloplane habitats. The ISSR analysis revealed high genotypic diversity among the *B. bassiana* isolates on the neighbourhood scale, and the isolates were clustered according to the habitat. These results suggest that the entomopathogenic Hypocreales in the phylloplane could result from the dispersal of fungal propagules from the soil, which might be their habitat of origin; a few isolates, including EABb 09/28-Fil of *Beauveria bassiana*, inhabit only the phylloplane.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: cr2qumoe@uco.es (E. Quesada-Moraga).

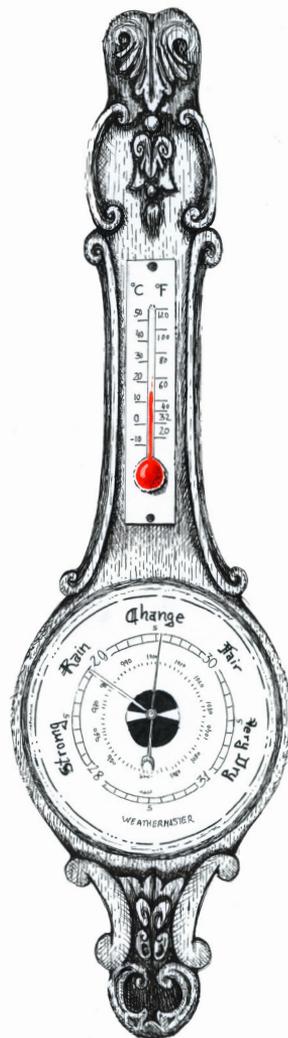
¹ Both authors contributed equally to this work.

Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems

The diversity of entomopathogenic Hypocreales from the soil and phylloplanes in five Mediterranean cropping systems with different degrees of management [organic olive orchard conventional olive orchard, holm oak reforestation, holm oak dehesa (a multifunctional agro-sylvo-pastoral system), and sunflower plantation] was studied during four seasons. A total of 697 entomopathogenic fungal isolates were obtained from 272 soil samples, 1608 crop phylloplane samples and 1368 weed phylloplane samples. The following nine species were identified: *Beauveria amorpha*, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense*, *M. robertsii*, *Paecilomyces marquandii* and *Purpureocillium lilacinum* using EF-1 α gene sequences. All the fungal entomopathogenic species were found in both the soil and phylloplane samples, with the exception of *M. robertsii*, which was only isolated from the soil. The species richness, diversity (Shannon–Wiener index) and evenness (Pielou index) were calculated for each cropping system, yielding the following species ranking, which was correlated with the crop management intensity: holm oak reforestation > organic olive orchard > conventional olive orchard > holm oak dehesa > sunflower plantation. The number of fungal species isolated was similar in both phylloplane habitats and dissimilar between the soil and the crop phylloplane habitats. The ISSR analysis revealed high genotypic diversity among the *B. bassiana* isolates on the neighbourhood scale, and the isolates were clustered according to the habitat. These results suggest that the entomopathogenic Hypocreales in the phylloplane could result from the dispersal of fungal propagules from the soil, which might be their habitat of origin; a few isolates, including EABb 09/28-Fil of *Beauveria bassiana*, inhabit only the phylloplane.

Capitolo III:

Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems



Este capítulo es una versión adaptada del artículo



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems



María Fernández-Bravo^a, Inmaculada Garrido-Jurado^a, Pablo Valverde-García^a, Jürg Enkerli^b, Enrique Quesada-Moraga^{a,*}

^a Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio C4 Celestino Mutis, 14071 Cordoba, Spain

^b Molecular Ecology, Institute for Sustainability Sciences, Agroscope, Reckenholzstrasse 191, 8046 Zurich, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2016

Revised 21 September 2016

Accepted 28 September 2016

Available online 29 September 2016

Keywords:

EF-1 α

Bloc

SSR

Epiphytes

Temperature

UV-B radiation

ABSTRACT

The response of entomopathogenic mitosporic ascomycete (EMAs) to abiotic stresses might be adapted to the microhabitats in which they inhabit. In phylloplane, these organisms are more exposed to such stresses than they are in soil, which may have led to adaptation to this environment. In the present work, we investigate whether *Beauveria bassiana* genotype or isolation habitat, i.e., soil or phylloplane, within the same geographic area influences their responses to key environmental stresses, such as temperature, moisture and ultraviolet radiation (UV-B), which can affect their successful use in microbial control. Twenty isolates of *B. bassiana* obtained from the soil and phylloplane in two ecosystems from southern Spain (holm oak dehesa and a reforested area) were selected to study the population distribution of these isolates and evaluate their thermal, humidity and UV-B requirements. Molecular characterization was conducted by using elongation factor-1 α (EF-1 α), the intergenic nuclear region Bloc and 15 microsatellite primers. The cluster analysis based on concatenated EF-1 α and Bloc sequences grouped the 20 isolates into five clades within *B. bassiana*, with Clades a, b, d and e containing both soil and phylloplane isolates and Clade c including three phylloplane isolates. The dendrogram and the minimal spanning network generated from the genetic distances among multilocus genotypes showed four divergent groups corresponding to the five clades obtained based on the sequence data (Clades b and d were represented in the same group), with a high degree of shared alleles within groups and few alleles shared among groups. Although no relationship was found between MLG and the habitat (soil or phylloplane) of isolation, isolates grouped into Clade c, all of which were collected from phylloplane, formed a separate group of MLGs. To investigate our hypothesis, the responses to temperature (germination and colony growth evaluated in the range 15–35 °C), water activity (conidia germination evaluated against values of a_w between 1 and 0.862) and UV-B exposure (conidia exposed to 920 or 1200 mW m⁻² for 2, 4 or 6 h) of the soil and phylloplane isolates from the five clades were investigated. No associations of isolate-specific genetic or physiological characteristics with isolate habitat, i.e., soil or phylloplane, were found. These results provide no support for the hypothesis that EMAs strains from the phylloplane have evolved to resist unfavorable environmental conditions.

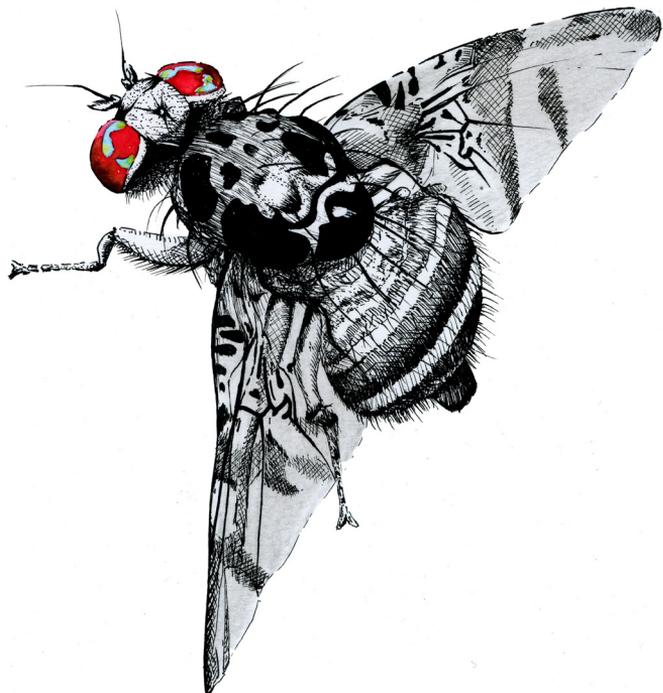
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems

The response of entomopathogenic mitosporic ascomycete (EMAs) to abiotic stresses might be adapted to the microhabitats in which they inhabit. In phylloplane, these organisms are more exposed to such stresses than they are in soil, which may have led to adaptation to this environment. In the present work, we investigate whether *Beauveria bassiana* genotype or isolation habitat, i.e., soil or phylloplane, within the same geographic area influences their responses to key environmental stresses, such as temperature, moisture and ultraviolet radiation (UV-B), which can affect their successful use in microbial control. Twenty isolates of *B. bassiana* obtained from the soil and phylloplane in two ecosystems from southern Spain (holm oak dehesa and a reforested area) were selected to study the population distribution of these isolates and evaluate their thermal, humidity and UV-B requirements. Molecular characterization was conducted by using elongation factor-1 α (EF-1 α), the intergenic nuclear region Bloc and 15 microsatellite primers. The cluster analysis based on concatenated EF-1 α and Bloc sequences grouped the 20 isolates into five clades within *B. bassiana*, with Clades a, b, d and e containing both soil and phylloplane isolates and Clade c including three phylloplane isolates. The dendrogram and the minimal spanning network generated from the genetic distances among multilocus genotypes showed four divergent groups corresponding to the five clades obtained based on the sequence data (Clades b and d were represented in the same group), with a high degree of shared alleles within groups and few alleles shared among groups. Although no relationship was found between MLG and the habitat (soil or phylloplane) of isolation, isolates grouped into Clade c, all of which were collected from phylloplane, formed a separate group of MLGs. To investigate our hypothesis, the responses to temperature (germination and colony growth evaluated in the range 15–35 °C), water activity (conidia germination evaluated against values of a_w between 1 and 0.862) and UV-B exposure (conidia exposed to 920 or 1200 m Wm⁻² for 2, 4 or 6 h) of the soil and phylloplane isolates from the five clades were investigated. No associations of isolate-specific genetic or physiological characteristics with isolate habitat, i.e., soil or phylloplane, were found. These results provide no support for the hypothesis that EMAs strains from the phylloplane have evolved to resist unfavourable

Capitolo IV:

UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. strains



Este capítulo es una versión adaptada del artículo aceptado en la revista Journal of Invertebrate Pathology con “Major Revision” el día 27 de marzo de 2017, con número de referencia JIP_2017_35 titulado:

“UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. strains”

cuyos autores han sido:

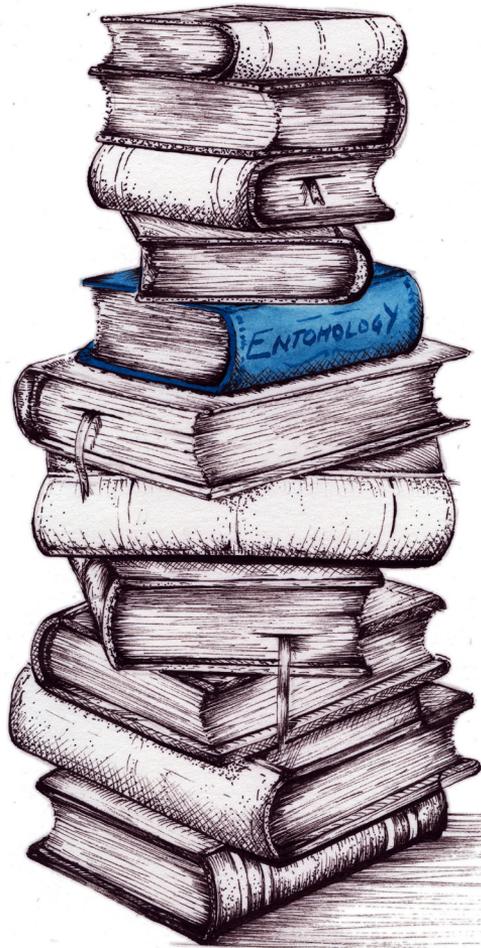
María Fernández-Bravo, Alejandro Flores-León, Salvador Calero-López, Fernando Gutiérrez-Sánchez, Pablo Valverde-García, Enrique Quesada-Moraga.

UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. strains

The selection of entomopathogenic mitosporic ascomycete strains (EMAs) adapted to specific UV-B radiation conditions is the first step in overcoming this key environmental constraint. Recent studies have demonstrated the presence of EMAs on the epigeal areas of weeds and woody plants in various Mediterranean ecosystems, and the question arises whether isolates from the phylloplane, which experiences greater exposure to environmental UV-B radiation than soil isolates do, could have better UV-B radiation tolerance. The *in vitro* response of phylloplane and soil strains of *Metarhizium* sp. to UV-B radiation and the *in vitro* and *in vivo* effects of UV-B radiation on the viability and virulence of a selected *M. brunneum* strain against *C. capitata* were determined in an attempt to answer that question. To achieve the former goal, the conidial germination, culturability and colony growth of 18 *Metarhizium* sp. strains from the soil and the phylloplanes of several Mediterranean ecosystems exposed to 1200 mW m⁻² for 2, 4 or 6 hours were evaluated. All strains showed a significant decrease in germination, colony growth and culturability associated with exposure time, germination rates below 30% and poor conidia recovery rates as indicated by poor culturability and low colony growth indexes after 6 hours of exposure. However, no relationship between the species *M. guizhouense*, *M. robertsii* or *M. brunneum* or the habitat from which the strain was isolated (i.e., the soil or the phylloplane) and the effect of UV-B radiation was found. Strain *M. brunneum* EAMa 01/58-Su, which showed a high tolerance to UV-B inactivation, was subsequently selected to investigate the UV-B related effects on virulence toward adult *C. capitata*. In a series of bioassays, pure dry conidia were irradiated with 1200 mW m⁻² for 6 hours before or after adult flies were inoculated. The viability and virulence were compared between UV-B-treated (UV-B treatments) and untreated (NO UV-B treatments) conidia. Irradiation of the conidia either prior to or after the flies were inoculated resulted in a significant 84.7 to 86.4% decrease in conidial viability, which viability rates below 10.2% in the UV-B treatments. Interestingly, this viability loss was consistent with a slightly significant reduction of EAMa 01/58-Su virulence when the conidia were irradiated prior to inoculation, with 100% and 91.4% adult mortality rates and 4.6 and 5.9 days average survival time for the NO UV-B and UV-B treatments, respectively. A second series of experiments on the virulence of strain EAMa 01/58-Su was performed to determine whether the UV-B effects were dose- or exposure time-dependent. Adult flies were inoculated with five doses in a ten-fold series (1.0x10⁴ to 1.0x10⁸ conidia ml⁻¹) and then irradiated at 1200 mW m⁻² for 6 hours, and similar LC₅₀ values, 3.8x10⁷ and 4.3x10⁷ conidia ml⁻¹, were determined for the UV-B and NO UV-B treatments, respectively. However, the LT₅₀ values for flies inoculated with 1.0x10⁸ conidia ml⁻¹ and with 1.0x10⁷ conidia ml⁻¹ were 15.1% and 30.8% longer for UV-B treatments than NO UV-B treatments, respectively. Next, adult flies were treated with 1.0x10⁸ conidia ml⁻¹ and then exposed to 1200 mW m⁻² for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 hours, and the relationships among exposure time and conidia viability and fly mortality loss were determined. According to our “logistic 3 parameters” model, the exposure time for adult flies at 1200 mW m⁻² to achieve a 50% reduction in fly mortality was 47.2 hours, which was longer than that of 5.6 hours required for a 50% reduction in conidia viability. Our results reveal the lack of correspondence between conidial viability losses, approximately 85% in conidia irradiated on both Petri plates and insects, and virulence, with a remaining viable number of conidia exceeding the threshold to cause disease. These results allow the elucidation of the UV-B-related *Metarhizium* sp. rate and the extent of the propagule and virulence loss and could facilitate strain selection and formulation to overcome UV-B inactivation.

Capítulo V:

Discusión general



V.- Discusión general

El incremento del rendimiento de los cultivos y la reducción de las pérdidas de cosecha debidas a plagas, enfermedades y malas hierbas son dos retos decisivos de la Agricultura actual, para garantizar la calidad y seguridad alimentarias (Foley et al., 2011; Popp et al., 2013). Los insecticidas químicos han sido, hasta el momento, una herramienta muy importante al servicio del segundo reto, y su correcta utilización ha aportado a los agricultores importantes coeficientes de retorno (Popp et al., 2013). Sin embargo, desde el atardecer de la revolución verde, se ha producido un incremento continuo y exponencial de la preocupación social por el efecto de los insecticidas sobre el medioambiente y los seres vivos, plasmado ya en el siglo XXI en políticas que promulgan el uso sostenible de estos compuestos, con gran énfasis en el empleo de alternativas no químicas a los mismos (Foley et al., 2011).

El empleo de bioinsecticidas, con énfasis en entomófagos y entomopatógenos, emerge en la actualidad como la gran alternativa a los insecticidas químicos, y ha despertado el interés reciente de las grandes multinacionales, hasta hace poco ajenas a estas soluciones biológicas (Popp et al., 2013). Existen dos elementos muy importantes que ralentizan el desarrollo de estos agentes, de una parte el registro, que sigue pautas análogas a las de los insecticidas químicos, si bien se necesitan entre 3 y 6 años y de 16 a 18 millones de euros para registrar un entomopatógeno, mientras que esto se extiende a 10 años y más de 200 millones para los segundos (REBECA, 2017). Por otra parte, la eficacia de estos insecticidas microbianos en campo no satisface con frecuencia las expectativas, en gran parte debido a la poca competencia

ambiental de las cepas seleccionadas, cuya actividad queda neutralizada por distintos factores bióticos y abióticos, donde destaca la radiación solar UV-B (Meying y Eilemberg, 2007; Vega et al., 2009).

Esta Tesis ha pretendido dilucidar el efecto real de la radiación UV-B sobre la virulencia de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs), así como la presencia natural de estos hongos en el filoplano, donde las condiciones ambientales operantes no parecen favorables para su presencia, y su relación con la respuesta a las condiciones de temperatura, humedad y radiación UV-B. A lo largo de los distintos capítulos de la presente Tesis Doctoral se ha constatado la presencia, diversidad y dinámica poblacional de los AMEs en el suelo y filoplano de plantas herbáceas y leñosas en cinco ecosistemas mediterráneos con diferentes grados de manejo (olivar ecológico, olivar tradicional, reforestación de encina, dehesa y plantación de girasol) durante las cuatro estaciones de un año completo. Además, se ha evaluado la respuesta diferencial de aislados pertenecientes a varias especies de AMEs (procedentes de suelo y filoplano), a distintos factores abióticos de estrés, que determinan su presencia, persistencia y virulencia, con el fin de obtener herramientas útiles para la selección de cepas con competencia ambiental.

En el capítulo II, los intensos muestreos realizados en el suelo y filoplano de los ecosistemas antes mencionados, han proporcionado un total de 697 aislados de AMEs procedentes de 272 muestras de suelo, 1608 muestras de filoplano de olivo, encina y girasol y 1368 muestras de filoplano de plantas herbáceas, todos ellos pertenecientes a nueve especies de AMEs: *Beauveria*

amorpha, *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense*, *M. robertsii*, *Paecilomyces marquandii* y *Purpureocillium lilacinum*, los cuales fueron identificados mediante el estudio morfológico y la secuenciación del gen EF-1 α (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Garrido-Jurado et al., 2011). Todas estas especies fueron obtenidas a partir de muestras de suelo y filoplano, con la excepción de *M. robertsii* y *P. marquandii*, presentes sólo en el primero. La riqueza de especies, así como la diversidad (índice de Shannon-Wiener) y la uniformidad (índice de Pielou) se calcularon para cada ecosistema, con lo que se obtuvo el siguiente rango relacionado con la intensidad de manejo de cada ecosistema: repoblación de encina > olivar ecológico > olivar tradicional > dehesa > plantación de girasol. Un hecho que corrobora referencias recientes que apuntan a la importancia del grado de perturbación natural y antropogénica del ecosistema sobre la composición del microbiota de AMEs (Steenberg, 1995; Bidochka et al., 1998; Meyling y Eilemberg, 2006; Quesada-Moraga et al., 2007). Por otro lado, la mayor parte de los aislados fueron obtenidos en primavera y verano, en contra de aquellos estudios del norte de Europa en que estos máximos se producen en otoño, posiblemente debido a que en clima mediterráneo las mayores temperaturas y radiación UV-B de los meses de verano, reducen el microbiota de AMEs en el siguiente otoño. Por ello, la respuesta diferencial de algunos de estos aislados a temperatura, humedad y radiación UV-B ha sido abordada en los capítulos III y IV de la presente Tesis Doctoral.

Para profundizar en la dinámica poblacional de los aislados presentes en el suelo y

filoplano así como la posible relación entre ellos, se seleccionó un conjunto de 43 aislados de *B. bassiana*, todos ellos procedentes del mismo punto de muestreo (una encina del ecosistema dehesa) y de los tres hábitats posibles (suelo, filoplano de encina y filoplano de flora arvense bajo la copa de la encina) que fueron analizados mediante 4 marcadores inter-microsatélites (ISSR) (Ormond et al., 2010), lo que reveló una alta diversidad genotípica, no relacionada de forma directa con el hábitat de aislamiento (suelo o filoplano). Los resultados de éste capítulo sugieren que la dispersión de la mayoría de los propágulos fúngicos tiene su origen en el suelo, su principal reservorio, y alcanza el filoplano de las plantas por el viento o la actividad de los insectos (Meyling y Eilemberg., 2006; Howe et al., 2016). Una evidencia adicional a este hallazgo es la presencia de los mismos grupos genéticos en los tres hábitats muestreados, suelo, filoplano de planta leñosa y filoplano de planta herbácea bajo la copa. No obstante, se ha detectado por primera vez la presencia de algunos aislados con un mismo perfil genético y distante del resto, sólo en el filoplano de encina, lo que sugiere la existencia de genotipos de AMEs adaptados al filoplano, como verdaderos epífitos.

Estos resultados impulsaron otro de los grandes objetivos de la Tesis, dilucidar la posible respuesta diferencial de los aislados procedentes del filoplano respecto a los del suelo frente a factores abióticos de estrés (la temperatura, humedad y radiación UV-B), por las condiciones particulares de exposición de los microorganismos del filoplano a las mismas. Estas cuestiones se han abordado en el capítulo III del presente trabajo, a partir de 20 aislados de *B. bassiana* procedentes del capítulo anterior, y seleccionados

con base en su genotipo y hábitat de aislamiento (suelo y filoplano de plantas leñosas) o el ecosistema (dehesa y repoblación de encina), cuya respuesta relativa a la temperatura, la humedad y la radiación ultravioleta (UV-B) ha sido determinada, como medida de su competencia ambiental y su empleo con éxito en el control integrado de plagas.

En primer lugar, se profundizó en la distribución poblacional de los 20 aislados de *B. bassiana* mediante su caracterización molecular a través de la secuenciación del gen EF-1 α (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Garrido-Jurado et al., 2011) y la región intergénica nuclear (Bloc) (Rehner et al., 2006), y se evaluó la diversidad genotípica mediante 15 marcadores microsatélites (SSR) (Meyling et al., 2012). El análisis basado en las secuencias concatenadas EF-1 α y Bloc agrupó a los 20 aislados en cinco clados distintos, 4 de ellos que contenían aislados tanto de suelo como de filoplano, mientras que un clado estuvo integrado sólo por tres aislados de filoplano, ya referenciados en el capítulo II como posibles verdaderos epífitos. Además, el dendrograma y la red de expansión mínima generada a partir de las distancias genéticas, dieron lugar a cuatro grupos de genotipos divergentes correspondientes a los cinco clados obtenidos a partir de los datos de las secuencias, con un alto grado de alelos compartidos dentro de los grupos, donde de nuevo emerge un grupo del filoplano con un genotipo muy marcado y distante del resto.

Para investigar la hipótesis de partida sobre la posible existencia de ventajas adaptativas de los aislados de filoplano frente a los mencionados factores ambientales, se evaluó el efecto de la temperatura (germinación y crecimiento de colonias evaluadas entre 15-

35 °C), la actividad del agua (a_w) (germinación de conidios evaluada frente a valores de a_w entre 1 y 0.862) y exposición UV-B (germinación y capacidad de recuperación de conidios expuestos a 920 o 1200 mW m⁻² durante 2, 4 ó 6 h) sobre los 20 aislados de *B. bassiana* seleccionados. No se encontró relación entre tipo de secuencia (EF-1 α y Bloc), el genotipo, el hábitat de aislamiento (suelo o filoplano) o el ecosistema (dehesa o repoblación de encina) con la respuesta a estos factores ambientales. Sin embargo, sí se observó cómo algunos aislados mostraron una respuesta particular frente a condiciones subóptimas de estos factores, con énfasis en el aislado EABb 09/20-Fil, que mostró: (1) una alta resistencia a la inactivación por radiación UV-B, (2) un alto porcentaje de germinación a 30 °C en relación con los demás aislados y (3) una germinación inferior a 0.92 (a_w), medio mínimo para el óptimo crecimiento de la mayoría de especies fúngicas (Gillespie y Crawford, 1986), resultados que identifican a éste aislado como un excelente candidato para el control integrado de plagas en ambientes semiáridos. No obstante, éstos resultados no apoyan la hipótesis de que las cepas del filoplano hayan evolucionado paralelamente para resistir condiciones ambientales desfavorables.

Existe una amplia bibliografía en la que se demuestra que el factor más limitante para el crecimiento y normal funcionamiento de AMEs es el relativo a la radiación UV-B, si bien, no son frecuentes las investigaciones sobre el efecto *in vitro* e *in vivo* de la radiación UV-B sobre el la eficacia proceso patogénico de estos hongos. En este sentido, en el capítulo IV se evalúa la respuesta *in vitro* de 18 aislados de *Metarhizium* sp. (*Metarhizium guizhouense*, *M. robertsii* y

M. brunneum) a la radiación UV-B en términos de crecimiento y capacidad de recuperación, así como los efectos *in vitro* e *in vivo* de dicha radiación sobre la viabilidad y virulencia de uno de estos aislados frente a adultos de *C. capitata*.

La germinación y la capacidad de recuperación de los 18 aislados de *Metarhizium* sp. procedentes del suelo y filoplano de varios ecosistemas mediterráneos se evaluó mediante su exposición a 1200 mW m^{-2} durante 2, 4 ó 6 horas. Todas las cepas mostraron una disminución significativa en la tasa de germinación inferior al 30%, así como en la capacidad de recuperación de los conidios, todo ello asociado con el tiempo de exposición. Sin embargo, y como ocurrió en el caso de *B. bassiana* en el capítulo III, no se encontró relación entre las especies (*M. guizhouense*, *M. robertsii* o *M. brunneum*) o el hábitat de aislamiento (el suelo o el filoplano) y el efecto de la radiación UV-B, si bien, los aislados de *B. bassiana* podrían ser más resistentes a la inactivación por UV-B que los de *Metarhizium* sp., a pesar de que estos últimos poseen una mayor pigmentación que los hialinos de *Beauveria*. Más allá, entre esos pigmentos no se encuentra la melanina, responsable de la protección celular frente a la radiación UV, hecho que explicaría por qué los conidios de *Metarhizium* son más susceptibles a la radiación UV (Fargues et al., 1996).

Finalmente, se seleccionó la cepa EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* por su buena respuesta a la radiación UV-B, y su alta virulencia frente a *C. capitata*, para determinar el efecto de la UV-B sobre su viabilidad y virulencia, tanto cuando la radiación alcanza a los conidios en sustratos inertes, como cuando lo hace sobre el exoesqueleto del

insecto. En una primera serie de ensayos, los conidios puros del hongo se irradiaron a 1200 mW m^{-2} durante 6 horas en placas Petri, antes o después de inocular a las moscas adultas. Como resultado se observó que el efecto de la radiación UV-B es algo mayor cuando los conidios fueron irradiados antes de tratar los insectos, e inexistente cuando las moscas fueron tratadas y posteriormente irradiadas. No obstante, la viabilidad en ambos casos se redujo un 60%. La siguiente serie de experimentos pretendió evaluar el efecto de exposición a UV-B de los conidios directamente sobre el insecto, una vez realizado el tratamiento. Para ello, las moscas adultas fueron inoculadas con cinco dosis de conidios de esta cepa (1.0×10^4 a 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 y 1.0×10^8 conidios ml^{-1}), e irradiadas a 1.200 mW m^{-2} durante 6 horas, obteniéndose valores similares de CL_{50} tanto si las moscas fueron irradiadas como en las del testigo, con valores de 3.8×10^7 y 4.3×10^7 conidios ml^{-1} , respectivamente. Sin embargo, los valores de TL_{50} para las moscas inoculadas con 1.0×10^8 conidios ml^{-1} fueron 9.3 y 7.9 días para los tratamientos irradiados y no irradiados, respectivamente. De la misma manera, los valores de TL_{50} para las moscas inoculadas con 1.0×10^7 conidios ml^{-1} fueron 14.6 y 10.1 días para los tratamientos irradiados y no irradiados, respectivamente. En todos los casos en que las moscas tratadas fueron irradiadas, se observó una pérdida de viabilidad de conidios importante, similar al obtenido en el ensayo anterior, por lo que la dosis del hongo aplicada no parece estar asociada a la pérdida de viabilidad de conidios y no en la pérdida de virulencia.

Finalmente, se inocularon adultos de *C. capitata* con una suspensión de 1.0×10^8 conidios ml^{-1} de la cepa EAMa 01/58-Su

de *M. brunneum*, y posteriormente fueron expuestas a 1200 mW m⁻² durante 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas, para evaluar el efecto del tiempo de exposición sobre la virulencia de dicha cepa. De acuerdo con el modelo logístico de 3 parámetros y el modelo exponencial aplicados, el tiempo de exposición de las moscas adultas tratadas con el hongo e irradiadas a 1200 mW m⁻² necesario para lograr un 50% de reducción fue de 47.2 horas, mientras que el tiempo necesario para reducir la viabilidad de conidios un 50% a la misma intensidad de radiación es 5.6 horas. Estos resultados sugieren que en el intervalo temporal previo a la pérdida de viabilidad de conidios, un porcentaje de los mismos ha culminado la etapa de pre-penetración del proceso infeccioso, lo que limita el posterior efecto de la radiación UV-B. En efecto, la fase de penetración del tubo germinativo tiene lugar durante las 12-48 horas tras la inoculación (Bechara et al., 2011), por lo que es lógico pensar que la fase de pre-penetración tiene lugar aún más temprano, por lo que la disminución de viabilidad de conidios debido a la exposición a la radiación UV-B no es suficiente para evitar que un número viable de los mismo supere el umbral para comenzar el proceso patogénico.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral aportan herramientas que facilitan la búsqueda y selección de cepas AMEs mejor adaptadas a las condiciones reinantes y con mayor competencia ambiental a las zonas donde se van a utilizar, para superar, con ayuda de la formulación y el método de aplicación, la principal limitación para su eficaz desarrollo y empleo en campo en programas de control integrado de plagas.

Referencias:

- Bechara, I. J., Destéfano, R. H. R., Bresil, C., Messias, C. L., 2011. Histopathological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). Brazilian Journal of Biology 71: 91-98
- Bidochka, M. J., Kasperski, J. E., Wild, G. A. M., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near northern habitats. Canadian Journal of Botany 76: 1198-1204
- Fargues, J., Goettle, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., Lomer, C. J., Rougier, M., 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. Mycopathologia 133: 171-181
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D. P. M., 2011. Solutions for a cultivated planet. Nature 478: 337-342
- Garrido-Jurado, I., Marquez, M., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Alvarez, C., Iturrriaga, E. A., Quesada-Moraga, E., Monte, E., Hermosa, R., 2011. Genetic analyses place most Spanish isolates of *Beauveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution. BMC Microbiology 11: 84
- Gillespie, A. T., Crawford, E., 1986. Effect

- of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. and *Verticillium lecanii*. En: Samson, R. A., Vlak, J. M., Peters, D. (Eds.), *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*, Wageningen. Society of Invertebrate Pathology, pp 254
- Howe, A. G., Ravn, H. P., Jensen, A. B., Meyling, N. V., 2016. Spatial and taxonomical overlap of fungi on phylloplanes and invasive alien ladybirds with fungal infections in tree crowns of urban green spaces. *FEMS Microbiology Ecology* 92: fiw143
- Kullnig-Gradinger, M., Szakacs, G., Kubicek, C. P., 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multi-gene approach. *Mycological Research* 106: 757-767
- Meyling N.V., Eilenberg J., 2006. Isolation and characterization of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research* 110: 188-195
- Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-55
- Meyling, N. V., Pilz, C., Keller, S., Widmer, F., Enkerli, J., 2012. Diversity of *Beauveria* spp. isolates from pollen beetles *Meligethes aeneus* in Switzerland. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 76-82
- Ormond, E. L., Thomas, A. P. M., Pugh, P. J. A., 2010. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 146-54
- Popp, J., Pető, K., Nagy, J., 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33: 243-255
- Quesada-Moraga E., Navas-Cortés J. A., Maranhao E. A., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Álvarez C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and agricultural soils. *Mycological Research* 111: 947-966
- REBECA, 2007. Balancing the benefits and costs of regulating biological plant protection products, WS 6 Synthesis, Deliverable No 25, Regulation of Biological Control Agents (REBECA)
- Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., Vega, F. E., 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 11-21
- Steenberg, T., 1995. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to *Sitona* species and other insects in Lucerne. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzon, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., Roy, H. E., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159

Capitulo VI:

Conclusiones



VI.- Conclusiones

A lo largo de los distintos capítulos de la presente Tesis Doctoral se han obtenido una serie de conclusiones que se enumeran de forma resumida a continuación. Las conclusiones número 1, 2 y 3 corresponden al capítulo II, *Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems* publicado en la revista Journal of Invertebrate Pathology 130 (2015) 97-106 (Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”. Las conclusiones 4 y 5 corresponden al capítulo III, que incluye el artículo *Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of Beauveria bassiana from two holm oak ecosystems* publicado en la revista Journal of Invertebrate Pathology 141 (2016) 6-17. Finalmente, las conclusiones 6, 7 y 8 corresponden al capítulo IV, “*UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil Metarhizium sp. strains*”, enviado a la revista Journal of Invertebrate Pathology, aceptado con “Major Revisions” el 27 de marzo de 2017.

1.- El análisis combinado de los marcadores EF-1 α e ISSR proporciona una alta sensibilidad para la detección y estudio de la presencia, diversidad y distribución poblacional de AMEs en el medio natural.

2.- Existe una importante presencia de AMEs en el filoplano de plantas leñosas y herbáceas en diferentes ecosistemas mediterráneos, aparentemente procedentes del suelo, considerado su principal reservorio. No obstante, existe un grupo genético con aislados sólo procedentes del filoplano de encina, lo que nos lleva a pensar que podría tratarse de un nuevo carácter de los AMEs, como epífitos, no descrito hasta la fecha.

3.- La diversidad y dinámica poblacional de AMEs depende en gran medida del grado de manejo de los ecosistemas en los que se encuentran, es decir, existe una mayor diversidad de AMEs cuanto menos modificado está el medio, así como de la estación del año, con mayor presencia en primavera, sin embargo, dicha diversidad y dinámica poblacional no guardan relación directa con la presencia de AMEs en el suelo y el filoplano de plantas leñosas o herbáceas.

4.- No se encuentra relación entre el tipo de secuencia (EF-1 α y Bloc), el genotipo, el hábitat de aislamiento (suelo o filoplano) o el ecosistema (dehesa o repoblación de encina) de los 20 aislados de *B. bassiana* seleccionados y su respuesta a la temperatura, la actividad del agua o la radiación UV-B, lo que cuestiona la hipótesis de que las cepas del filoplano hayan podido evolucionar para resistir condiciones ambientales desfavorables.

5.- Existen aislados de *B. bassiana* con una respuesta excepcional frente a factores abióticos típicos de ambientes áridos, que no guarda relación con su genotipo, hábitat o ecosistema de aislamiento.

6.- Tampoco se observa una relación entre el hábitat de aislamiento o el ecosistema de los aislados de *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense* y *M. robertsii* y su respuesta a la radiación UV-B.

7.- Existe un efecto significativo de la radiación UV-B sobre la virulencia de la cepa EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* frente a adultos de *C. capitata*, que sólo depende del tiempo de exposición de sus conidios a dicha radiación y no de la dosis del hongo suministrada a los insectos, a pesar de existir una importante reducción en la viabilidad de los conidios irradiados. Este efecto es mayor en conidios expuestos a la radiación sobre una superficie inerte, placa Petri, que cuando la irradiación se produce sobre el insecto, una vez realizado el tratamiento. A este respecto, la disminución de la viabilidad de los conidios debido a la exposición a la radiación UV-B no es suficiente para evitar que un número viable de conidios restantes supere el umbral para comenzar el proceso patogénico.

8.- El tiempo de exposición a 1.200 mW m^{-2} de adultos de *C. capitata* tratados con la cepa EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* para reducir un 50% la mortalidad es de 47.2 horas, mientras que el tiempo necesario para reducir la viabilidad de conidios un 50% a la misma intensidad de radiación es 5.6 horas, lo que podría indicar que cuando la viabilidad de los conidios comienza a bajar, la fase de pre-penetración del hongo en el insecto ya ha comenzado, junto con el proceso patogénico, de ahí que la virulencia no se vea afectada en la misma proporción que la viabilidad de conidios.

VI.- Conclusions

The publications and conclusions of this Doctoral Thesis are indicated below. Conclusions 1, 2 and 3 have been reached from chapter II, *Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems* published in Journal of Invertebrate Pathology 130 (2015) 97-106 [Impact Factor: 2.198, Q1 (18/161) in “Zoology”]. Conclusions 4 and 5 have been obtained from chapter III, *Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of Beauveria bassiana from two holm oak ecosystems* published in Journal of Invertebrate Pathology 141 (2016) 6-17. Finally, conclusions 6, 7 and 8 has been resulted from chapter IV, *UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil Metarhizium sp. strains*, accepted with “Major Revisions” in Journal of Invertebrate Pathology on March, 27th 2017.

1.- The combined analysis of elongation factor-1 alpha (EF-1 α) and inter simple sequence repeat (ISSR) was revealed to be highly sensitive for AMEs species identification and presence, diversity and distribution studies of EMAs in natural environments.

2.- The phylloplane of crops and weeds in the selected Mediterranean ecosystems was shown to be rich in AMEs, with phylloplane isolates probably originating from the soil, the main reservoir of AMEs. Nonetheless, a single genetic group of isolates from the phylloplane was found, which suggests a new role of AMEs as epiphytes.

3.- The agroecosystem management intensity together with the season influenced the diversity and population dynamics of EMAs, with the former promoted by low modification grade and springtime. However, such a relationship was not found for the presence of EMAs in the soil and phylloplane of the crops and weeds for the selected Mediterranean ecosystems.

4.- No relationship between the sequence type (EF-1 α y Bloc), genotype, isolation habitat (soil of phylloplane) or ecosystems (dehesa or holm oak reforestation) was found for the selected 20 *Beauveria bassiana* isolates and their response to the temperature, water activity and UV-B radiation. These results question the hypothesis that isolates from phylloplane could be better adapted to extreme environmental conditions than the isolates from soil.

5.- Some *B. bassiana* isolates showed outstanding responses to environmental stresses typical of arid climate, which were not related to their genotype, habitat and agroecosystem of isolation.

6.- Response to UV-B radiation of *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense* and *M. robertsii* was not either related to the habitat or agroecosystem of isolation.

7.- UV-B radiation significantly affected the virulence of *M. brunneum* EAMa 01/58-Su strain against *C. capitata* adults, with this effect being dependent on the exposure time but not related to fungal dosage. Indeed, this effect was higher in the experiment with conidia irradiated on a Petri plate prior to adult fly inoculation than in the experiment with conidia irradiated on the insect host. To this end, the steady decrease of the conidial viability due to UV-B exposure was not enough to avoid a viable number of conidia remaining that exceeded the threshold to cause disease.

8.- The exposure time for *C. capitata* adults inoculated with *M. brunneum* EAMa 01/58-Su strain and irradiated at 1200 mW m^{-2} to achieve 50% reduction in fly mortality was 47.2 hours, longer than the one required for a 50% reduction in conidia viability, which was 5.6 hours. That could be due to the onset of *M. brunneum* infection cycle at pre-penetration phases prior to viability declining because of the UV-B exposure; thus limiting the impact of UV-B exposure on virulence in terms of mortality but not on survival time, with a lower number of infective conidia penetrating the host.

Anexo I

**Estancia en el centro de investigación
“Federal Research Station, Agroscope”, en Zurich, Suiza**

Objetivos de la estancia

Como actividad complementaria a la Tesis Doctoral se realizó una estancia de 4 meses en Zurich, Suiza, en el centro “Federal Research Station Agroscope” bajo la supervisión del Dr. Jürg Enkerli, investigador senior del grupo “Molecular Ecology”.

El objetivo principal de ésta tesis es el estudio de la diversidad genética y la dinámica poblacional de hongos entomopatógenos aislados del filoplano y suelo de ecosistemas mediterráneos, así como el estudio de la tolerancia de dichos aislados a factores climáticos tan limitantes para ellos como la temperatura, radiación UV-B y actividad del agua, entre otros. Durante los **cuatro meses** que duró la estancia en el centro de investigación “Federal Research Station Agroscope”, **el objetivo** fué el estudio y comprensión a través del análisis de los marcadores “microsatélites” (SSR) aplicada a la evaluación de la ecología y dinámica poblacional de los hongos entomopatógenos en los ecosistemas mediterráneos.

Para ello, 49 aislados procedentes de diferentes hábitats [suelo y filoplano de plantas adventicias y leñosas (*Quercus ilex*) tanto del exterior de la hoja (epífitos), como procedentes del interior de las mismas (endófitos)] fueron seleccionados. Casi todos ellos, excepto los endófitos, fueron seleccionados del trabajo que comprende el capítulo II de la presente Tesis Doctoral y que corresponde al artículo publicado en la revista Q1 “Journal of Invertebrate Pathology” de título “Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems” (Garrido-Jurado, et al., 2015).

Plan de trabajo realizado y resultados ob-

tenidos

-Primera etapa: aprendizaje de técnicas utilizadas por el grupo de investigación “Molecular Ecology” del centro “Federal Research Station Agroscope” de Zurich, Suiza, para el análisis de la ecología y dinámica poblacional de los hongos entomopatógenos en los ecosistemas mediterráneos.

Las secuencias de tipo SSR son extremadamente abundantes en los genomas de células eucariotas, y en menor medida en los procariontes. Estas secuencias son unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un gran número de veces. Todas las secuencias SSR se definen por el tipo de unidad que se repite y por el lugar que ocupan en el genoma (*locus*). La variación se manifiesta como diferencias en la longitud entre los distintos *alelos* del mismo *locus*, una longitud que es el resultado de la existencia de un número variable de repeticiones del motivo básico, todos ellos originados por la acumulación de errores provocados por el deslizamiento de la polimerasa en la replicación del ADN. No obstante, aunque los microsatélites presentan una alta tasa de mutación, las regiones flanqueantes están muy conservadas y son las que se utilizan para la amplificación concreta de los *alelos* de cada *locus*. Son estas regiones las que se usan para el diseño de los cebadores o marcadores y el análisis de los SSR.

El trabajo realizado en el “Federal Research Station Agroscope” de Suiza, consistió en la amplificación a través de la técnica PCR de 18 cebadores o marcadores moleculares SSR diseñados para la especie *Beauverria bassiana* (Rehner and Buckley, 2005; Meyling et al., 2009). Estos cebadores están marcados con fluorocromos de distintos colores que permiten la utilización de grupos de

cebadores en la misma reacción PCR. Dicha reacción se denomina “PCR multiplex”, la cual consiste en la ampliación de varios *loci* SSR simultáneamente, para lo que es necesario optimizar las condiciones de la PCR, seleccionando cebadores que no interaccionen entre sí, con similar temperatura de unión de cebadores y con alelos en diferentes rangos de tamaño. Tras la amplificación de los cebadores, se procedió a la lectura de los fragmentos amplificados mediante un secuenciador automático de fragmentos basado en la electroforesis capilar que determina el tamaño exacto del fragmento amplificado o *alelo* el cual servirá, junto con el resto de *alelos*, para determinar los genotipos de la población objeto de estudio.

Paralelamente, se adquirieron conocimientos de ecología molecular y dinámica poblacional de microorganismos en ecosistemas naturales que permitió profundizar más en el trabajo realizado.

-Segunda etapa: análisis de los 49 aislados de *Beauveria bassiana*. Los aislados proceden de la micoteca del grupo de investigación “Entomología Agrícola” (Grupo PAIDI AGR 163) del Departamento Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba. Los aislados resultan de estudios previos realizados en el ámbito de la presente Tesis Doctora, 46 de ellos proceden del trabajo que engloba el Capítulo II (Garrido-Jurado, et al., 2015), y los tres restantes de trabajos realizados en paralelo dentro del mismo contexto en los mismos puntos de muestreo. La hábitats de asilamiento de los 49 aislados fueron: 8 procedentes del suelo, 28 fueron aislados del filoplano de encina (epífitos), 3 del interior de hojas de encina (endófitos) y por último 10 aislados procedentes del filoplano de plantas herbáceas

bajo la copa del árbol de donde se tomaron el resto de muestras. Es importante remarcar que todos los aislados procedían del mismo ecosistema (dehesa de encina) y el mismo punto de muestreo (mismo árbol).

El primer paso fue extraer el ADN de los 49 aislados de *Beauveria bassiana* mediante la técnica utilizada por Reader and Broda (1985). Tras la purificación, cuantificación y estandarización de la concentración de ADN en cada muestra se procedió a la amplificación mediante “PCR multiplex” de los cebadores SSR en grupos de 3, previamente marcados con tres fluorocromos de distinto color. El producto de PCR obtenido tras la reacción fue diluido y tratado con Formamida, para una mejor separación y lectura en el secuenciador. Como los cebadores fueron marcados con fluorocromos de diferentes colores, la técnica permitió la detección de todos los alelos amplificados simultáneamente en cada reacción (Fig. 1). La metodología seguida para la amplificación y análisis se encuentra recogida en el capítulo III de la presente Tesis Doctoral.

Una vez obtenidos todos los *alelos* para todos los aislados, se procedió a la interpretación y análisis mediante diferentes programas informáticos. En primer lugar, para la determinación de los alelos se utilizó el software GeneMarker®. Una vez obtenidos todos los alelos, estos fueron analizados con el paquete “poppr” para el software R, con el fin de establecer los distintos genotipos y la relación o distancias genéticas entre ellos. **Como resultado** se obtuvieron 34 “microsatellite multilocus genotypes” (MGL) o genotipos para los 49 aislados de *B. bassiana* (Fig. 2).

El genotipo MGL 16 muestra aislados del suelo, filoplano de planta leñosa, filoplano

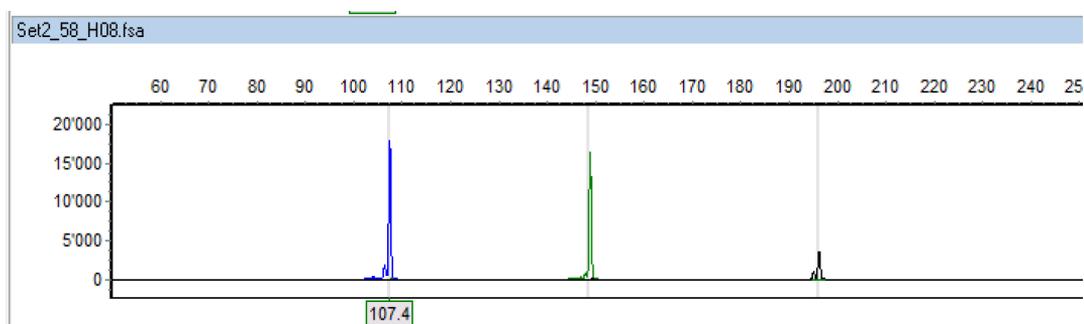


Figura 1. Electroferograma obtenido mediante secuenciador automático donde se muestran 3 alelos marcados con distintos fluorocromos.

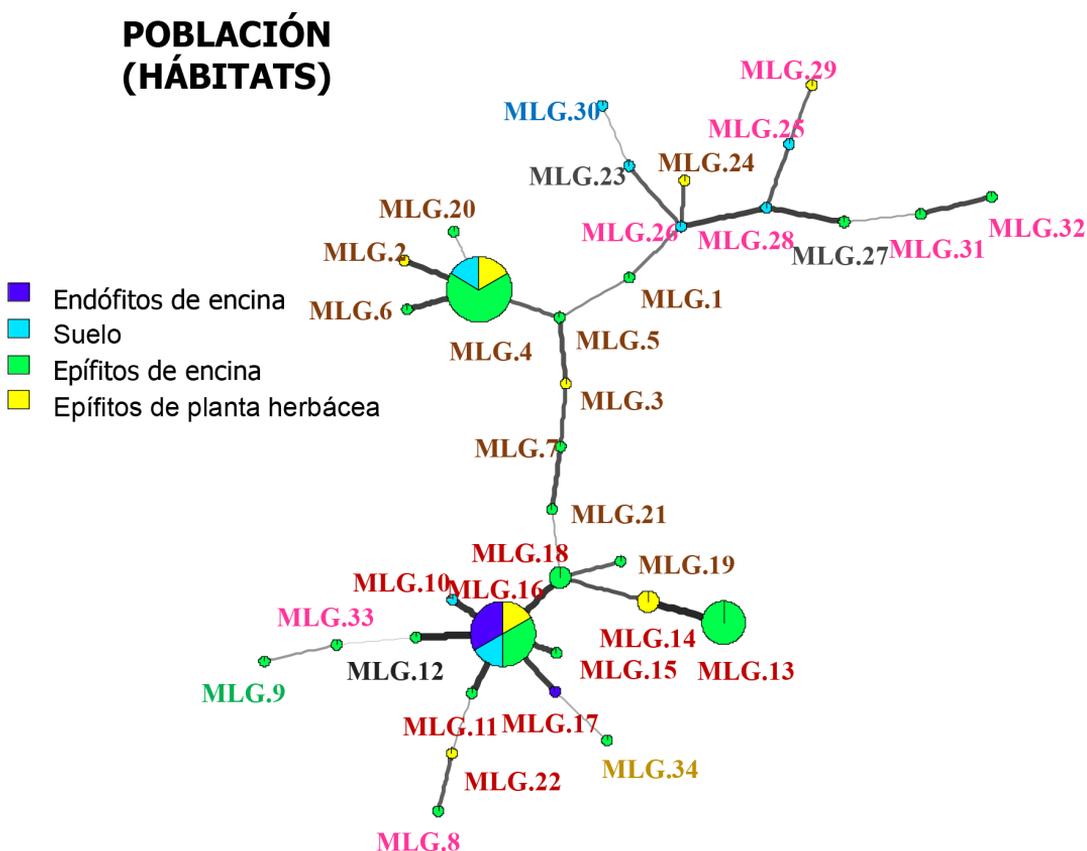


Figura 2. Diagrama “Minimum spanning networks” para los distintos “microsatellite multicolous genotypes” (MGLs) de *Beauveria bassiana*. El tamaño de los vértices representa, en proporción, el número de clones para cada genotipo. Las líneas gruesas y oscuras representa una distancia genética entre los genotipos muy próxima, por el contrario, líneas finas y claras representan grandes distancias genéticas entre los genotipos.

de planta adventicia y endófitos en la planta leñosa, lo que sugiere que existe un flujo de aislados desde el suelo (principal reservorio de estos hongos entomatógenos) hacia la planta, bien sea a través del viento o por la

actividad forética de los insectos que portan consigo los propágulos de dichos hongos, llegando, incluso a penetrar dentro del filopiano de las plantas.

Previamente, los 49 aislados fueron ana-

lizados mediante el marcador “Factor de Elongación 1 alpha (EF-1 α)” siguiendo la metodología propuesta en el capítulo II (Garrido-Jurado et al., 2015), del cual se obtuvieron 7 secuencias tipo distintas (Tabla 1, Fig. 3). De la misma forma que con los SSR, también se obtuvo una secuencia tipo (ST)

con aislados que procedían de los 4 hábitats muestreados (ST4) (Tabla 1), lo que confirma los resultados obtenidos para el análisis de los marcadores SSR.

De nuevo aparece una secuencia tipo, la ST5 que corresponde con el MLG9, que forman un grupo aislado y distante del resto de ce-

Tabla 1. Número de aislados por cada secuencia tipo (ST) y hábitat de aislamiento.

ST	Hábitat de aislamiento			
	Filoplano de herbáceas (epífita)	Filoplano de encina (epífita)	Filoplano de encina (endófito)	Suelo
ST1	1	-	4	4
ST2	4	-	11	1
ST4	5	1	9	1
ST5	-	-	1	-
ST9	-	-	1	-
ST8	-	-	1	-
STN	-	2	1	2

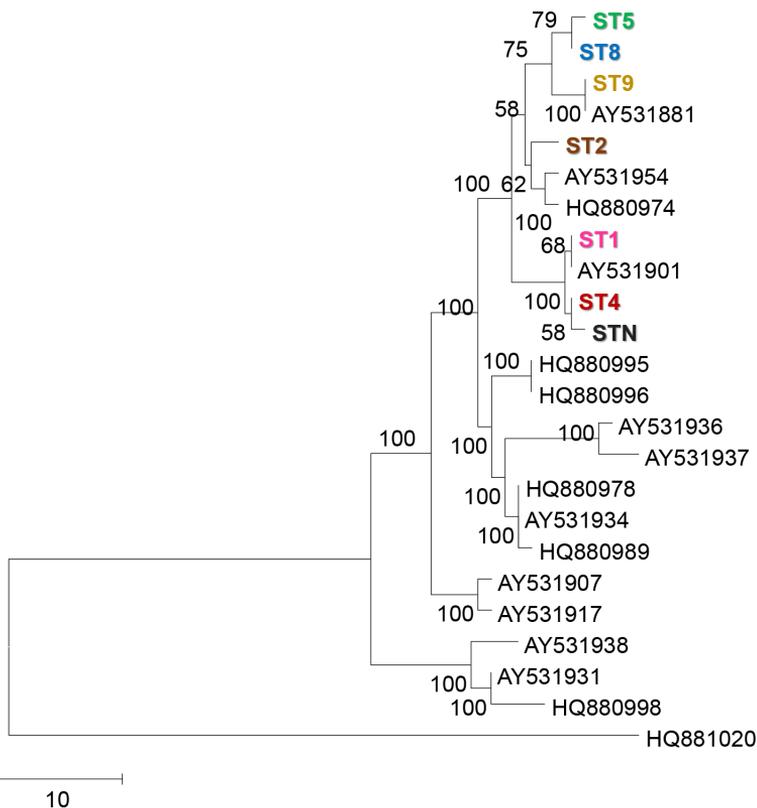


Figura 3. Árbol filogenético obtenido mediante el método de MP y el algoritmo de búsqueda TBR para la región EF-1 α . Los valores con menos del 50% de verosimilitud fueron eliminados. 10 representa la distancia genética para el método CNI.

pas obtenidas y que podrían ser verdaderos epifitos, resultados que coinciden con los mencionados tanto en el capítulo II como en el capítulo III de la presente Tesis Doctoral. Por lo que se puede concluir que el análisis combinado de la región EF-1 α y los marcadores SSR determinan la estructura genética de los 49 aislados de *Beauveria bassiana* obtenidos de cuatro hábitats distintos en una encina del ecosistema dehesa.

Finalmente, mencionar que los resultados incluidos en el capítulo III de la presente Tesis Doctoral concernientes al análisis de la dinámica poblacional de los aislados de *Beauveria bassiana* evaluados en ese trabajo mediante marcadores SSR fué realizado durante ésta estancia.

Resultados

Los resultados de este trabajo actualmente están siendo elaborados para su posterior publicación.

No obstante, estos resultados ya han sido presentados como comunicación en póster con el título “Genetic structure of *Beauveria bassiana* in different habitats of a holm oak tree”, en el congreso “49th annual meeting of society for invertebrate pathology and international congress on invertebrate pathology and microbial control”, celebrado en Tours (Francia) en Julio de 2016.

Referencias

- Garrido-Jurado, I., Fernández-Bravo, M., Compos, C., Quesada-Moraga, E., 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 97-106
- Meyling, N. V., Lubeck, M., Buckley, E.P., Eilenberg, J., Rehner, S.A., 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* 18: 1282-1293
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20
- Rehner, S. A., Buckley, E. P., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-97

Anexo II

Producción científica derivada de la Tesis Doctoral

Contribución a revistas internacionales de carácter científico (SCI):

- Garrido-Jurado, I.¹, **Fernández-Bravo, M.**¹, Campos, C., Quesada-Moraga, E., 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplane of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 97-106. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”. ¹Ambos autores contribuyen igual en este trabajo.
- **Fernández-Bravo, M.**, Garrido-Jurado, I., Velarde-García, P., Enkerli, J., Quesada-Moraga, E., 2016. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. *Journal of Invertebrate Pathology* 144: 6-17. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”.
- **Fernández-Bravo, M.**, Flores-León, A., Calero-López, S., Gutiérrez-Sánchez, F., Valverde-García, P., Quesada-Moraga, E., 2017. UV-B radiation-related effects on conidial inactivation and virulence against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae) of phylloplane and soil *Metarhizium* sp. Strains. *Journal of Invertebrate Pathology*. Aceptado con “Major Revisión” el 27 de marzo de 2017. Factor de Impacto: 2.198, Q1 (18/161) en “Zoology”.

Aportaciones científicas en congresos nacionales:

- **Fernández-Bravo, M.**, Quesada-Moraga, E., Garrido-Jurado, I. 2013. Diversidad y ecología de hongos entomopatógenos procedentes de diferentes hábitats y ecosistemas mediterráneos. Póster. Congreso: VIII Nacional de Entomología Aplicada. XIV Jornadas Científicas de la SEEA. Publicación: Libro de abstracts. Lugar De Celebración: Mataró (España).
- **Fernández-Bravo, M.**, Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2013. Efecto de la temperatura, la actividad del agua y la radiación UV-B sobre la germinación y crecimiento de aislados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. procedentes del suelo y filoplano. Comunicación oral. Congreso: VIII Nacional de Entomología Aplicada. XIV Jornadas Científicas de la SEEA. Publicación: Libro de abstracts. Lugar De Celebración: Mataró (España).
- **Fernández-Bravo, M.**, Flores-León, A., Calero-López, S., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2015. Radiación UV-B y virulencia del hongo entomopatógeno *Metarhizium* sp. (Ascomycota: Hypocreales). Comunicación oral. Congreso: IX Nacional de Entomología Aplicada. XIV Jornadas Científicas de la SEEA. Publicación: Libro de abstracts pp 89. Lugar De Celebración: Valencia (España).

- **Fernández-Bravo, M.** 2016. La dosis de aplicación y el period de exposición a la radiación UV.B determinan la virulencia de un aislado de *Metarhizium brunneum* sobre la “Mosca Mediterránea de la Fruta” *Ceratitits capitata* (Wideman) (Diptera; Tephritidae). Congreso: V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Comunicación oral. Lugar De Celebración: Córdoba (España).

Aportaciones científicas en congresos internacionales:

- **Fernández-Bravo, M.,** Quesada-Moraga, E., Garrido-Jurado, I. 2013. Entomopathogenic fungi ecology and diversity from different Mediterranean ecosystems. Comunicación oral. Congreso: 14th IOBC/wprs Working Group “Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes”. Publicación: IOBC/wprs Bull, 90: pp. 41. Lugar De Celebración: Zagreb (Croacia).
- **Fernández-Bravo, M.,** Garrido-Jurado, I., Oreste, M., Quesada-Moraga, E. 2013. Effect of temperature, water activity and UV-B radiation on conidia germination and colony growth of *Beauveria bassiana* isolates from soil and phylloplane Comunicación oral. Congreso: 14th IOBC/wprs Working Group “Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes”. Publicación: IOBC/wprs Bull, 90: pp. 130. Lugar De Celebración: Zagreb (Croacia).
- **Fernández-Bravo, M.,** Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2014. Effect of temperatura, wáter activity and UV-B radiation on conidia germination and colony growth of *Beauveria bassiana* isolates from soil and phylloplane. Comunicación oral. Congreso: 47th anual meeting of society for invertebrate pathology and international congress on invertebrate pathology and microbial control. Publicación: Libro de abstracts pp 53. Lugar De Celebración: Mainz (Alemania).
- **Fernández-Bravo, M.,** Flores-León, A., Calero-Lopez, S., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2015. Efect of UV-B raditation on germination, colony growth and virulence of *Metarhizium* sp. Isolates agaisnt “Mediterranean fruit fly” *Ceratitits capitata* (Widemann) (Diptera; Tephritidae). Comunicación oral. Congreso: 15th IOBC/wprs Working Group “Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes” Publicación: IOBC/wprs. Publicación: Libro de abstracts pp 33. Lugar De Celebración: Riga (Lettonia).
- **Fernández-Bravo, M.,** Garrido-Jurado, I., El-Betar, M., Romero, E., Yousef, M., Quesada-Moraga, E. 2016. Crude extracts secreted by entomopathogenic mitosporic ascomycetes show potencial for *Ceratitits capitata* (Widemann) (Diptera; Tephritidae)

and *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera; Drosophilidae) control. Congreso: 49th anual meeting of society for invertebrate pathology and international congress on invertebrate pathology and microbial control. Comunicación oral. Publicación: Libro de abstracts pp 68. Lugar De Celebración: Tours (Francia).

- **Fernández-Bravo, M.**, Meyerhofer, J., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., Enkerli, J.. 2016. Genetic structure of *Beauveria bassiana* in different habitats of a holm oak tree. Congreso: 49th anual meeting of society for invertebrate pathology and international congress on invertebrate pathology and microbial control. Póster. Publicación: Libro de abstracts pp 108. Lugar De Celebración: Tours (Francia).

Otras aportaciones:

- Codirección del Proyecto Fin de Carrera: Efecto de la radiación UV-B sobre el crecimiento y virulencia de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn y *Metarhizium brunneum* Petch procedentes del suelo y filoplano de distintos ecosistemas mediterráneos. Alumno: D. Salvador Calero López. Universidad de Córdoba. E.T.S.I.A.M. Septiembre de 2015. Calificación: 10.
- Codirección del Trabajo Fin de Grado: Efecto de la radiación ultravioleta UV-B sobre la actividad del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* (Petch) frente a la “mosca mediterránea de la fruta” *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera; Tephritidae). Alumno: D. Alejandro Flores León. Universidad de Córdoba. E.T.S.I.A.M. Septiembre de 2014. Calificación: 10.
- Codirección del Trabajo Fin de Grado: Efecto del periodo de exposición a la radiación UV-B sobre la viabilidad de conidios y virulencia del ascomiceto mitospórico entomopatógeno *Metarhizium brunneum* Petch. Alumno: D. Fernando Gutiérrez Sánchez. Universidad de Córdoba. E.T.S.I.A.M. Septiembre de 2016. Calificación: 9.
- Codirección del Trabajo Fin de Grado: Control de adultos de la “mosca mediterránea de la fruta”, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), mediante extractos del ascomiceto mitospórico *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson. Alumna: Dña. María Élodie Romero Palacio. Universidad de Córdoba. E.T.S.I.A.M. Pendiente de lectura curso 2016/2017. Calificación: -.

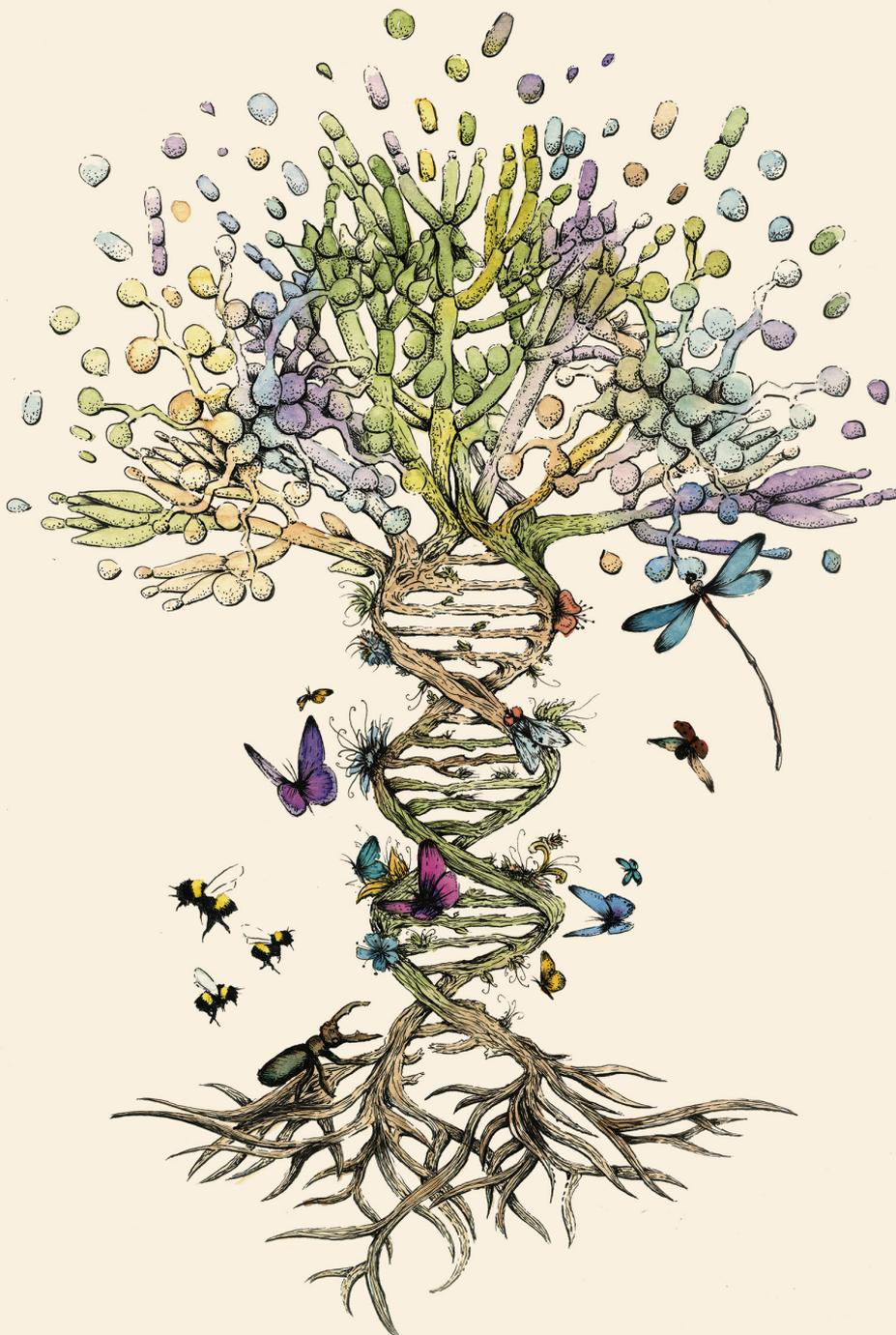
TITULO: *Diversidad, dinámica poblacional y ecología de hongos entomopatógenos de suelo y filoplano de sistemas agroforestales mediterráneos y efecto de la radiación UV-B sobre su virulencia*

AUTOR: *María del Carmen Fernández Bravo*

ILUSTRACIONES: *María del Carmen Fernández Bravo*

PORTADA: *Juan Manuel Domínguez Asensio; María del Carmen Fernández Bravo*

Mayo de 2017



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes
Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales