



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
AGRÓNOMOS Y DE MONTES**

**TESIS DOCTORAL**

**LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS  
MOLÉCULAS EN EL CONTROL DE TEFRÍTIDOS  
(DIPTERA: TEPHRITIDAE) Y SU EFECTO CONTRA  
HONGOS DE SUELO PATÓGENOS DE OLIVO.**

**DIRECTORES**

**PROF. DR. ENRIQUE QUESADA MORAGA  
PROF. DR. ANTONIO TRAPERO CASAS**

**DOCTORANDA**

**MARÍA DENIS LOZANO TOVAR**

**CÓRDOBA, ESPAÑA  
NOVIEMBRE 2015**

TITULO: *Los hongos entomopatógenos y sus moléculas en el control de tefrítidos (Diptera: Tephritidae) y su efecto contra hongos de suelo patógenos de olivo.*

AUTOR: *María Denis Lozano Tovar*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
AGRÓNOMOS Y DE MONTES**

**PROGRAMA DE DOCTORADO “CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS  
AGRARIAS, ALIMENTARIAS, DE LOS RECURSOS  
NATURALES Y DEL DESARROLLO RURAL”**

**TESIS DOCTORAL  
LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS MOLÉCULAS  
EN EL CONTROL DE TEFRÍTIDOS (DIPTERA:  
TEPHRITIDAE) Y SU EFECTO CONTRA HONGOS DE  
SUELO PATÓGENOS DE OLIVO.**

**DIRECTORES  
PROF. DR. ENRIQUE QUESADA MORAGA  
PROF. DR. ANTONIO TRAPERO CASAS**

**DOCTORANDA  
MARIA DENIS LOZANO TOVAR**

**CÓRDOBA, ESPAÑA  
NOVIEMBRE 2015**

**TÍTULO:** Los hongos entomopatógenos y sus moléculas en el control de tefritidos (Diptera: Tephritidae) y su efecto contra hongos de suelo patógenos de olivo.

**AUTOR:** Maria Denis Lozano Tovar

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015

Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A

14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)

[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)



**TÍTULO DE LA TESIS: Los hongos entomopatógenos y sus moléculas en el control de tefritidos (diptera: tephritidae) y su efecto contra hongos de suelo patógenos de olivo.**

**DOCTORANDO/A: Maria Denis Lozano Tovar**

**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).

Esta tesis reúne el desarrollo de tres trabajos de investigación enfocados a la búsqueda de alternativas ecológicamente viables y eficaces para el manejo de las principales limitantes fitosanitarias del cultivo del olivo. Mediante un sistema de trabajo multidisciplinar entre los Grupos PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” del departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales y PAIDI AGR 216 “Patología Agroforestal” del departamento de Agronomía, de la Universidad de Córdoba- España, se buscó dilucidar si los hongos entomopatógenos aplicados en el suelo para el control de estados preimaginales de tefritidos, podrían tener impacto en otras comunidades de microorganismos presentes en el suelo, en particular los hongos fitopatógenos, que de ser antagonistas, supondría un manejo novedoso dentro del escenario del Control Integrado de Plagas y Enfermedades en el olivar.

El trabajo titulado “Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive”, permitió seleccionar aislados con potencial insecticida para el control de estados pre-imaginales de *C. capitata* y evidenciar la actividad antifúngica de los extractos y dializados obtenidos de dos aislados de hongos entomopatógenos (EAMa 01/58 Su de *M. brunneum* y EABb 09/16 Su de *B. bassiana*) contra *V. dahliae* y *P. megasperma* e *inundata*.

El siguiente estudio denominado “Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)”, contribuyó a determinar la capacidad de uno de los aislado (*M. brunneum* EAMb 09/01-Su), en secretar moléculas con actividad insecticida como las destruxinas, las cuales fueron probadas sobre adultos de *C. capitata* con excelentes resultados.

Finalmente con el tercer trabajo "*Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungi release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens", se cumplieron los objetivos propuestos con esta investigación, logrando determinar que los hongos entomopatógenos evaluados producen compuestos con actividad antifúngica que inhibieron el crecimiento micelial y la germinación de propágulos de *V. dahliae* y *P. megasperma in vitro* y redujeron los síntomas de la Verticilosis en plantas bajo condiciones controladas.

Los dos primeros trabajos fueron ya publicados en revistas de alto impacto (Biological Control y Journal Economic Entomology) y el tercero está en proceso de publicación. Igualmente los resultados de la tesis doctoral han sido presentados a la academia en diferentes congresos Nacionales e Internacionales.

Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas, A., Quesada-Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control* 67:409-420

Lozano-Tovar, MD., Garrido-Jurado, I., Lafont, F., Quesada-Moraga, E. 2015. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal Economic Entomology*. 108: 462-472.

Lozano-Tovar, M.D., Quesada-Moraga, E., Varo, A. Trapero, A. 2012. Efecto de la aplicación de hongos entomopatógenos sobre el desarrollo de la verticilosis en condiciones controladas XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. 17-21 de septiembre PAN-70. Málaga, Málaga-España.

Varo, A., Raya, M. C., Roca, L. F., Lozano-Tovar, M. D., Trapero, A. 2012. Producción de microesclerocios de *Verticillium dahliae* para la infestación artificial del suelo. 17-21 de Septiembre PAN-106. Málaga, Málaga-España.

Lozano-Tovar, M.D., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2012. Potencial of secondary metabolites secreted by the entomopathogenic mitosporic ascomycetes *Beauveria* sp and *Metarhizium* spp for medfly *Ceratitis capitata* adult control. XII Internacional Citrus. Congress Valencia Valencia-España.

Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Roca, L.F., Trapero, A. 2010. Efecto de hongos entomopatógenos y sus extractos sobre aislados de *Verticillium dahliae* y *Phytophthora* spp. patógenos del olivo. XV congreso de la

Sociedad Española de Fitopatología Sep. 17 PAN 75. Vitoria-Gasteiz  
España.

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

Córdoba, 10 de Noviembre de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.:

  
Enrique Quesada Moraga

Fdo.

  
Antonio Trapero Casas.

## DEDICATORIA

### *No te rindas*

No te rindas, aún estás a  
tiempo  
De alcanzar y comenzar de  
nuevo,  
Aceptar tus sombras,  
Enterrar tus miedos,  
Liberar el lastre,  
Retomar el vuelo.  
No te rindas que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destruir el tiempo,  
Correr los escombros,  
Y destapar el cielo.  
No te rindas, por favor no cedas,  
Aunque el frío queme,  
Aunque el miedo muerda,  
Aunque el sol se esconda,  
Y se calle el viento,  
Aún hay fuego en tu alma  
Aún hay vida en tus sueños.  
Porque la vida es tuya y tuyo  
también el deseo

Porque lo has querido y  
porque te quiero  
Porque existe el vino y el  
amor, es cierto.  
Porque no hay heridas que  
no cure el tiempo.  
Abrir las puertas,  
Quitar los cerrojos,  
Abandonar las murallas que  
te protegieron,  
Vivir la vida y aceptar el reto,  
Recuperar la risa,  
Ensayar un canto,  
Bajar la guardia y extender las  
manos  
Desplegar las alas  
E intentar de nuevo,  
Celebrar la vida y retomar los  
cielos.

### *A mis hijos*

No te rindas, por favor  
no cedas,  
Aunque el frío queme,  
Aunque el miedo  
muerda,  
Aunque el sol se ponga  
y se calle el viento,  
Aún hay fuego en tu  
alma,  
Aún hay vida en tus  
sueños  
Porque cada día es un  
comienzo nuevo,  
Porque esta es la hora y el  
mejor momento.  
Porque no estás solo,  
porque yo te quiero.

*Mario Benedetti*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me colaboraron para alcanzar este sueño.

Al Dr. Enrique Quesada Moraga por su disposición a asesorarme y apoyarme en el proceso de aprendizaje y en el enfoque investigativo del proyecto.

Al Dr. Antonio Trapero Casas por brindarme la oportunidad de participar en su equipo de trabajo y orientarme en el desarrollo del trabajo.

Al Director del programa de doctorado Dr. José Emilio Guerrero por su amistad y constante interés en el desarrollo de la investigación.

A Paqui Luque por su profesionalismo, constante apoyo, calidez y motivación en los momentos difíciles.

A Francisco Carmona por su colaboración incondicional y compañerismo.

Al Dr. Miguel Blanco López, por sus consejos y sugerencias.

A Inmaculada Garrido y Almudena Ortiz por sus consejos, sugerencias y disposición para ayudarme siempre.

A Luis Roca y Javier López por su atención y orientaciones

A Leovigilda Ortiz por su cariño, amistad y constante colaboración.

A Gloria Resquin, María Serrano y Milad Yousset por su amistad, cariño y disposición a ayudarme siempre. .

Y a todos los integrantes del grupo de patología agroforestal y al grupo de entomología agrícola por su colaboración, compañerismo y amistad.

Al PROGRAMA DE DOCTORADO DEL SISTEMA DE LOS INIA<sub>s</sub> DE IBEROAMERICA, por brindarme esta gran oportunidad de vida.

A la CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA CORPOICA por su apoyo.

Al proyecto AGR08-3635 de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y a la Interprofesional del Aceite de Oliva Español por la financiación de estas investigaciones.

A todos los amigos españoles, colombianos y de otras nacionalidades que hicieron de mi estadia en esta hermosa región de Andalucía, placentera y amable.

A mi familia por su apoyo incodicional y motivación constante.

# PRESENTACIÓN

La relación reversible entre la agricultura sostenible y la adaptación al cambio climático ha convertido a la reducción de riesgos para la salud y el medio ambiente en un área prioritaria para los gobiernos y las organizaciones agrícolas de todo el mundo, lo que ha terminado por cambiar el panorama de desarrollo y regulación de los productos para la protección de cultivos. La tendencia actual incide en la limitación del acceso de los agricultores a los productos para la protección de cultivos y en paralelo, al desarrollo de programas de investigación para la búsqueda y puesta a punto de nuevos métodos de control de plagas y enfermedades más adaptados a las componentes económica, social y ambiental que convergen en la actividad agrícola. No extraña que en este contexto haya irrumpido con fuerza en los últimos años en la comunidad científica internacional el empleo de microorganismos (control microbiano) y moléculas de origen natural para el control de plagas y enfermedades.

Un caso que reviste especial importancia es el de los dípteros carpófagos, en particular las especies que reciben el nombre genérico de “moscas de la fruta”, porque con muy pocas excepciones, atacan a la gran mayoría de especies frutales de que se ocupa la agricultura. La familia Tephritidae, a la cual pertenecen las “moscas de la fruta”, es la de mayor importancia económica a nivel mundial, dentro de esta destacan plagas claves en la agricultura mediterránea como *Ceratitis capitata* (Wiedemann) “mosca mediterránea de la fruta” y *Bactrocera oleae* (Gmelin.) “mosca del olivo”, cuya importancia económica es notable en la fruticultura y olivicultura respectivamente. En la actualidad, el control de *C. capitata* y *B. oleae* se basa principalmente en el empleo de insecticidas químicos de síntesis en

tratamientos cebo, aunque la evidencia experimental del último lustro ha situado a los hongos entomopatógenos (HE) como la gran alternativa para el control microbiano de tefrítidos, tanto de adultos en tratamientos aéreos, como de estados preimaginales en tratamientos de suelo, en la base del árbol. Además, los HE constituyen una fuente poco explorada de nuevas moléculas insecticidas de origen natural para el control de tefrítidos. Más allá, trabajos muy recientes ponen de manifiesto que algunos HE como los ascomicetos hipocreales, pueden desarrollar un papel ecológico adicional al que les es más propio, bien como endófitos, bien por su presencia en la rizosfera, e incluso como antagonistas de microorganismos fitopatógenos. La Verticilosis es una enfermedad que se presenta con altos niveles de incidencia y severidad en diversas zonas productoras de olivar en España. Las dificultades en su manejo y control, incrementan la necesidad de buscar alternativas eficientes y sostenibles para su manejo en este cultivo.

Esta tesis reúne los resultados de tres trabajos de investigación enfocados a la búsqueda de alternativas ecológicamente viables y eficaces para el manejo de las principales limitaciones fitosanitarias del cultivo del olivo. Es así como mediante un sistema de trabajo multidisciplinar entre los Grupos PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales y PAIDI AGR 216 “Patología Agroforestal” del Departamento de Agronomía, se buscó dilucidar si los HE aplicados en el suelo para el control de estados preimaginales de tefrítidos, podrían tener impacto en otras comunidades de microorganismos presentes en el suelo, en particular los hongos fitopatógenos, que de ser antagonistas, supondría un manejo novedoso dentro del escenario del Control Integrado de Plagas y Enfermedades en el olivar, generando por tanto una estrategia de protección dual contra insectos y enfermedades.

Con esta investigación se logró seleccionar un aislado EAMb09/01-Su de *M. brunneum* que produce metabolitos secundarios con alta capacidad insecticida y fungicida que causaron mortalidades de *C. capitata* por encima del 90% e inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma* en un 100% en pruebas *in vitro* y redujeron los síntomas de la Verticilosis en plantas hasta en un 58.9% bajo condiciones controladas.

Este documento está redactado con la esperanza de que su lectura sea fácil, agradable e interesante para los lectores.

**RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL DE D./D<sup>a</sup> MARIA DENIS LOZANO  
TOVAR**

**LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS MOLÉCULAS EN EL CONTROL  
DE TEFRÍTIDOS (DIPTERA: TEPHRITIDAE) Y SU EFECTO CONTRA  
HONGOS DE SUELO PATÓGENOS DE OLIVO.**

Esta tesis reúne el desarrollo de tres trabajos de investigación enfocados a la búsqueda de alternativas ecológicamente viables y eficaces para el manejo de las principales limitantes fitosanitarias del cultivo del olivo. Mediante un sistema de trabajo multidisciplinar entre los Grupos PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” del departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales y PAIDI AGR 216 “Patología Agroforestal” del departamento de Agronomía, de la Universidad de Córdoba- España, se buscó dilucidar si los hongos entomopatógenos aplicados en el suelo para el control de estados preimaginales de tefrítidos, podrían tener impacto en otras comunidades de microorganismos presentes en el

suelo, en particular los hongos fitopatógenos, que de ser antagonistas, supondría un manejo novedoso dentro del escenario del Control Integrado de Plagas y Enfermedades en el olivar.

**1. Introducción o motivación de la tesis**

El olivo (*Olea europea* L) es uno de los principales cultivos de España, ocupando una área importante en Andalucía con más de un millón y medio de hectáreas, que corresponden al 59.0% de la superficie nacional cultivada y al 27.0% de la Unión Europea, con un 90.0% de la producción de aceituna destinada a la producción de aceite y un 10.0% para aceituna de mesa (MAGRAMA, 2014). El olivo sufre el ataque de varios fitófagos que

limitan su producción y aumentan los costes de cultivo, entre ellos, destaca por su importancia la mosca del olivo *Bactrocera oleae* Gmelin (Díptera: Tephritidae), que causa daños directos al fruto, e indirectos al reducir la calidad del aceite obtenido, por aumentar la acidez y el deterioro de las características organolépticas en las aceitunas picadas (Haniotakis 2005, Topuz and Durmusoglu, 2008, Yousef, et al., 2013).

La producción del olivo también se ve afectada por hongos radiculares como *Verticillium dahliae* y *Phytophthora megasperma* e *P. inundata*. Se calcula que un 30% del olivar andaluz está afectado por verticilosis y en la actualidad no existe un método eficaz para su control por lo cual se requiere un enfoque integral para el manejo fitosanitario del cultivo (Sánchez-Hernández et al., 2001, Jiménez-Díaz et al., 2012). *V. dahliae* es el agente causal de esta enfermedad,

se encuentra ampliamente distribuido en todos los países de la cuenca mediterránea.

La verticilosis es de difícil control debido a la supervivencia del hongo en el suelo y a su ubicación en el xilema de la planta. En los últimos años ha adquirido gran relevancia y es considerada la principal amenaza fitosanitaria para el sector del olivar, debido a su expansión y a los graves ataques observados en Andalucía, más del 40% de los olivares están afectados por la enfermedad (Blanco-López, López-Escudero, 2007, López-Escudero, Mercado-Blanco, 2011, López-Escudero et al., 2003, Jiménez-Díaz et al., 2012).

Otra enfermedad que afecta principalmente a olivos jóvenes es la podredumbre radical asociada a *Phytophthora* spp., la cual tiene mayor ocurrencia en suelos arcillosos con tendencia a encharcamiento y puede llegar a ser severa en periodos prolongados de

lluvias (Sánchez et al., 1997). Los agentes causales son los oomicetos *P. megasperma* y *P. inundata*, siendo más frecuente en Andalucía la primera especie con un 65.0% de incidencia (Sánchez et al., 1998). Las especies de *Phytophthora* causantes de la podredumbre radical, son patógenos del suelo, capaces de afectar un amplio rango de especies tanto en agricultura como en ambientes naturales, causando daños económicamente importantes en todo el mundo (Blair et al., 2008).

La clara dependencia que tiene el control del tefritido de insecticidas químicos, junto con los nada desdeñables costes sociales a la salud pública y al medio que originan estos productos de síntesis, mantienen abierta la problemática medioambiental asociada al control de plagas en la fruticultura y promueven la implantación de nuevos métodos de control de enfermedades e insectos, que sean

inocuos a tales efectos, al amparo de los principios que rigen la sostenibilidad en la actividad agrícola. Muestra de ello es la reciente Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

Dentro del contexto del control biológico, un gran número de microorganismos hongos, levaduras, actinomicetos, bacterias han sido reportadas como benéficos por su capacidad de ser insecticidas, promotores de crecimiento vegetal, antagonistas de fitopatógenos y mejorar la protección de las plantas. Los hongos secretan un amplio grupo de compuestos, los cuales se caracterizan por su alta diversidad estructural, así como por su actividad biológica, se han identificado tanto compuestos de alto como de bajo peso molecular (Quesada-Moraga, Vey, 2004,

Quesada-Moraga, Santiago-Álvarez, 2008, Ortiz-Urquiza et al. 2010, 2009, Lozano-Tovar et al. 2015 ).

La bioprospección de metabolitos secundarios de origen microbiano ha permitido identificar nuevas moléculas biológicamente activas. Esta práctica se ha realizado desde el siglo XVIII, mediante la exploración de extractos de fermentaciones microbianas con actividad antibiótica (Higgs et al., 2001). Actualmente se convierten en una fuente importante de nuevos compuesto insecticidas, fungicidas y bactericidas (Vey et al., 2001, Quesada-Moraga, Vey, 2004, Sarabia et al., 2004, Quesada-Moraga et al., 2006, Ortiz-Urquiza et al., 2009).

La búsqueda de metabolitos provenientes de los microorganismos, representa un campo en rápido crecimiento. En estudios muy recientes, se ha constatado que la función ecológica de los ascomicetos mitospóricos

entomopatógenos puede traspasar la propia del control de insectos, con referencia a su función como promotores del crecimiento vegetal, capacidad endofítica e incluso su rol como agentes antagonistas de microorganismos fitopatógenos (Vega, 2008, 2009, Ownley *et al.*, 2008, Bruck, 2010). Este último aspecto puede ser debido a mecanismos como antibiosis, competición e incluso inducción de resistencia sistémica (Ownley *et al.*, 2008, Ownley *et al.*, 2010).

Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) son un componente importante de la microbiota del suelo, principalmente en suelos de olivar (Quesada-Moraga *et al.*, 2007), aunque su presencia también es notable en el filoplano del olivo (Quesada-Moraga, Santiago-Álvarez, 2008). La hipótesis fundamental de este trabajo plantea tres interrogantes: (1) ¿pueden los tratamientos de suelo con AME en la base del árbol



para el control de estados pre-imaginales tener un efecto contra hongos de suelo patógenos de olivo?, (2) ¿pueden los extractos fúngicos de estas cepas estar implicados en esta actividad?, (3) ¿pueden estos extractos y/o moléculas producidas por estos organismos ser utilizados para el control de adultos de tefritidos y los principales fitopatógenos del olivo? Para dar respuesta a estas preguntas se seleccionó a *C. capitata* como modelo de tefritido, así como *V. dahliae*, *P. megasperma* y *P. inundata*, como hongos del suelo patógenos de olivo de gran importancia económica.

## **2. Contenido de la investigación.**

### **2.1. Evaluación de hongos entomopatógenos y sus extractos contra plagas del suelo y patógenos radicales de olivo.**

El presente trabajo evaluó el posible doble control biológico de insectos y enfermedades del olivo

con hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos, como *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp., son potenciales para el control de la mosca del olivo tanto de adultos como de los estados pre-imaginales (larvas de tercer instar y puparios), los cuales generalmente se encuentran debajo de la copa de los árboles (Daane, Johnson 2010). Los tratamientos con hongos entomopatógenos dirigidos a controlar los estados pre-imaginales, pueden tener un impacto adicional en otras comunidades de microorganismos presentes en el suelo, tales como los agentes patógenos (*V. dahliae* y *Phytophthora* spp) presentes en el suelo del olivar.

Doce cepas pertenecientes a las especies de *Beauveria bassiana*, *Beauveria pseudobassiana*, *Beauveria varroae* y dos cepas de *Metarhizium brunneum* obtenidas del suelo y filoplano del olivo fueron evaluados en tratamientos de suelos

contra estados pre-imaginales de mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied), usada como modelo de manejo de *Bactrocera oleae*. Luego, los aislados seleccionados por su mayor actividad contra *C. capitata* fueron evaluados frente al crecimiento micelial de los fitopatógenos *V. dahliae* y *Phytophthora* spp, mediante el test de cultivo dual en placa. En este estudio cuatro aislados fitopatógenos fueron utilizados V004, V117 de *V. dahliae* y PO20 de *Phytophthora megasperma* y PO47 de *Phytophthora inundata*. Finalmente la actividad antifúngica de los extractos crudos de los aislados (EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* y EABb 09/16-Su de *B. bassiana* y sus fracciones dializadas y adializadas fueron evaluados frente a los aislados V117, V004 de *V. dahliae* y frente a los aislados PO20 y PO47 de *P. megasperma* y *P. inundata* respectivamente. Se utilizó

una cepa de *Trichoderma atroviride* como referencia.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los aislados entomopatógenos en las variables porcentaje total de pupas no viables con crecimiento micelial. Los aislados EABb 09/16-Su, (*B. bassiana*), EABb 09/07-Fil (*B. bassiana*) y EAMa 01/58-Su (*M. brunneum*), causaron las más altas mortalidades sobre los pre-imaginales de *C. capitata* con porcentajes de 45.0%, 42.5% y 40.0%, respectivamente. Igualmente cuando se evaluó el efecto sobre los adultos emergidos se presentaron diferencias estadísticas entre aislados siendo los aislados EABb 09/07-Fil (82.5%), EAMa 01/58-Su (75.0%) y EABb 09/16-Su (70.0%) los que registraron el mayor porcentaje de puparios y adultos emergidos con crecimiento fúngico, lo que pone de relieve el potencial de los tratamientos de suelo con hongos entomopatógenos no sólo

para reducir los estados pre-imaginales de los tefritidos sino también, los adultos que alcanzan a emerger pero cuya mortalidad se da antes se iniciar su periodo reproductivo, por lo tanto contribuyen a la reducción de daños en el olivar y en general reducción de la próxima generación de adultos.

En los ensayos de placa dual, *T. atroviride* causó entre un 64.0 y 79.0% de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* spp y *V. dahliae*, mientras que la inhibición del crecimiento micelial de los aislados de *Phytophthora* con *M. brunneum* y *B. bassiana* fue del 42.0 al 62.0% respectivamente y la inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* con estos dos aislados fue del 40.0 y 57.0% respectivamente. La formación de halos de inhibición demostró que la antibiosis es uno de los mecanismos de antagonismo de EAMa 01/58-Su y EABb 09/16-Su, lo cual fue corroborado por la actividad

inhibidora del crecimiento micelial de los extractos crudos. La evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones dializadas y adializadas de los hongos entomopatógenos obtenidos con una membrana porosa con un punto de corte de 3500 Da, mostró que la actividad antifúngica fue principalmente retenidas en las fracciones dializadas, lo que indica que los compuestos activos están relacionados en su mayoría con metabolitos secundarios. Del mismo modo, estas fracciones dializadas inhibieron la germinación de conidios (96-100%) y de microesclerocios (58-96%) de *V. dahliae* y propágulos de *P. megasperma* (38-100%). Estos resultados indican que los hongos entomopatógenos tienen el potencial como biocontrol tanto de insectos plagas del suelo como de las enfermedades del olivar.

**2.2. *Metarhizium brunneum* EAMB 09/01-Su, aislado con alta producción de destruxinas con actividad insecticida contra adultos de *Ceratitis capitata* (Díptera: tephritidae).**

Este trabajo evaluó la capacidad insecticida de aislados de *Metarhizium* y *Beauveria* contra adultos de *C. capitata* y profundizó en la caracterización de la actividad biológica del aislado EAMB09/01-Su de *M. brunneum* seleccionado por su eficacia en el control de adultos de *C. capitata*. Los extractos crudos de siete aislados de *Metarhizium* y uno de *Beauveria* fueron evaluados contra adultos de *C. capitata*. Para la purificación e identificación de los compuestos insecticidas, el extracto crudo de EAMB09/01-Su fue sometido a fraccionamiento orgánico, diálisis, cromatografía de columna en fase normal, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa y cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS). Todas las fracciones obtenidas y el perfil cromatógrafo de

HPLC fueron evaluados contra adultos de *C. capitata* en tratamiento con alimentación tratada. El tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y el tiempo medio de supervivencia (TMS) fueron determinados en la fracción más activa. La producción e identificación de destruxinas (dxs) fue confirmada por cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC). De la misma manera la producción de dtx A y A<sub>2</sub> de *M. brunneum* (EAMB 09/01-Su) fue comparada con la cepa de referencia ARSEF 23 utilizando cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS - VARIAN 1200 LCMS ESI).

Se presentaron diferencias estadísticas entre los aislados, el rango de mortalidad de los adultos varió entre 10 y 100% a las 48 horas después del tratamiento. El extracto crudo del aislado EAMB 09/01-Su, presentó porcentajes de mortalidad entre 95 y 100% a las 48 horas después de suministrado a los

insectos en alimentación tratada. Igualmente las fracciones obtenidas mediante diferentes técnicas de fraccionamiento presentaron diferencias estadísticas, siendo la fracción dializada y la fracción EtOAc:2-propanol:(1:9 v/v) obtenida por cromatografía de columna las que registraron mayor porcentaje de mortalidad entre 86.6 y 100%. El perfil cromatográfico obtenido por HPLC, mostró dos picos activos (denominados F5B y F6 sub-fracciones), los cuales fueron relacionados con dtx A<sub>2</sub> y A con mortalidades de 70 y 100% respectivamente a las 48 horas después de ser alimentados los insectos. La CL<sub>50</sub> de la F6 sub-fracción fue de 104.92 ppm de dtx A y la TL<sub>50</sub> fue de 4.16 horas a una concentración de 400 ppm de dtx A. Igualmente el TMS de los adultos expuestos a esta sub-fracción durante una hora fue de 12.6 horas.

De la misma manera la producción de dtx A y A<sub>2</sub> de *M.*

*brunneum* (EAMb 09/01-Su) fue comparada con la cepa de referencia ARSEF 23 utilizando cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS - VARIAN 1200 LCMS ESI), los resultados mostraron contenidos similares con valores de 830.5 y 884.5 ppm respectivamente, mientras que el análisis de producción de dtx A<sub>2</sub> fue 21% más alta para el aislado EAMb09/01-Su. Cuando se comparó la actividad insecticida de la sub-fracción F6 obtenida de ARSEF 23 y la sub-fracción F6 de EAMb09/01-Su a 400 ppm de destruxina A, los TL<sub>50</sub> fueron similares con valores de 5.29 y 4.13 h respectivamente, estos valores fueron muy cercanos al obtenido con el estándar de la dtx A (5.46), de igual manera el TMS de la sub-fracción F6 de EAMb 09/01-Su fue 7.7 h mientras que para la sub-fracción F6 de ARSEF 23 fue de 9.2 h y para el estándar dtx A fue 10.4, cuando los adultos fueron expuestos a estas sub fracciones durante 18

horas. Cuando los metabolitos insecticidas de la sub-fracción F6 fueron tratados con temperatura, éstos fueron resistentes a la exposición de 60°C por 2 horas y a 120 ° C durante 20 minutos, reteniendo su capacidad insecticida por encima del 90%. Lo anteriormente mencionado sugiere al aislado *Metarhizium brunneum* EAMB 09/01-Su como un recurso de nuevos compuestos de origen natural para el control de las mosca de las frutas.

### **2.3. Los hongos entomopatógenos *Metarhizium brunneum* y *Beauveria bassiana* producen metabolitos secundarios con actividad antagonista contra *Verticillium dahliae* y *Phytophthora megasperma*, patógenos del olivo.**

La actividad antifúngica del extracto crudo libre de células de *Metarhizium brunneum* (EAMB09/01-Su) y de *Beauveria bassiana* (EABb09/16-Su) fue evaluada contra los patógenos radicales del olivo: *Verticillium*

*dahliae* y *Phytophthora megasperma* obteniéndose el 100% de inhibición del crecimiento micelial. Luego los extractos fueron sometidos a diferentes técnicas de fraccionamiento para obtener los compuestos responsables de la actividad. *In vitro*, la fracción dializada, la fracción acuosa clorofórmica y la fracción metanólica de *Metarhizium brunneum* (EAMB09/01-Su) inhibieron 100% el crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma*, mientras que la fracción dializada, la fracción acuosa clorofórmica y la fracción metanólica obtenidas de *B. bassiana* EABb09/16-Su inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* en un 100% pero la fracción acuosa cloroformo y la fracción metanólica tuvieron baja eficiencia sobre *P. megasperma* inhibiendo solo el crecimiento micelial en un 46.7% y un 25.2% respectivamente. Con el fraccionamiento en columna de la fracción dializada de *Metarhizium*

*brunneum* (EAMb09/01-Su) se obtuvieron dos fracciones EtOAc:2-propanol 1:9 v/v 100% y H<sub>2</sub>O:MeOH 7:3 v/v 100%, los resultados mostraron que la actividad fungicida fue retenida en esta última fracción, la cual presentó halos de inhibición de 15.8 mm similares a los producidos por el extracto crudo (20.7) y redujo la germinación de microesclerocios de *V. dahliae* cuando fue evaluada en suelo natural y artificialmente infestado.

*In vivo* sobre plantas de algodón inoculadas con *V. dahliae* se determinó el efecto de la aplicación de fracción metanólica y tres aplicaciones de la fracción H<sub>2</sub>O-MeOH sobre el desarrollo de la verticilosis. La fracción metanólica redujo la severidad de los síntomas entre 38.9 y las tres aplicaciones de la fracción de H<sub>2</sub>O-MeOH redujeron los síntomas en un 58.9% obteniéndose plantas completamente sanas. Igualmente se evaluó el efecto de temperatura,

luz ultravioleta y pH sobre la actividad antifúngica. La fracción dializada de *M. brunneum* fue sometida a dos temperaturas a 60 °C por 2 h y a 120 °C por 20 minutos y expuesta a luz UV durante 2, 4, 6 h de 920 mW/m<sup>2</sup> irradiación. La actividad antifúngica fue estable a las dos temperaturas e igualmente a los tratamientos de luz UV. Sin embargo la exposición de la fracción dializada a pH 7.5 y 8.5 por 24 h disminuyó más del 60% su capacidad fungicida por lo tanto este factor es altamente limitante.

El presente estudio claramente muestra que el hongo entomopatógeno *M. brunneum* EAMb09/01-Su produce compuestos antifúngicos, que reducen el porcentaje de germinación de los microesclerocios de *V. dahliae* y afectan negativamente la formación de hifas, así como la conformación de colonias de microesclerocios, ya que las colonias germinadas no

generaron microsclerocios y disminuyen los síntomas de la severidad de la verticilosis en plantas. La profundización en el conocimiento de los metabolitos producidos por los hongos entomopatógenos, permitirá la generación de una alternativa en el manejo integrado de la verticilosis una de las enfermedades más limitantes en todas las regiones olivaderas del mundo y una estrategia fiable y sostenible para reducir la dependencia de los plaguicidas.

### 3. Conclusiones

Se determinó que los hongos entomopatógenos estudiados tienen efectos insecticidas y fungicidas y afectan negativamente el crecimiento de hongos fitopatógenos como *V. dahliae* y *Phytophthora* spp. Los aislados EABb09/16-Su y EABb09/07-Fil de *B. bassiana*, EABb09/23-Su de *B. pseudobassiana* y EABv09/01-Su

de *B. varroae* inhibieron el crecimiento micelial de *P. megasperma* y *P. inundata* entre un 43.7% y un 61.3% respectivamente y entre un 51.7% y 56.7% de *V. dahliae*, otro aspecto observado fue el crecimiento y esporulación de los hongos, *M. brunneum* y *B. bassiana* sobre los fitopatógenos con un comportamiento similar a *T. atroviride*. Se evidenció también que los hongos entomopatógenos tienen diferentes modos de acción sobre los fitopatógenos, uno de ellos, está relacionado con la antibiosis ya que en las diferentes pruebas cultivos duales, extractos crudos, fracciones dializadas, adializadas y orgánicas mostraron formación de halos de inhibición y reducción del crecimiento micelial de *V. dahliae* y *Phytophthora* spp, igualmente se observó efecto negativo sobre la germinación y formación de colonias de microsclerocios de *V. dahliae*, las principales estructuras de



resistencia y propagación del patógeno en campo.

Con esta investigación se logró seleccionar un aislado EAMb09/01-Su de *M. brunneum* que produce metabolitos secundarios con alta capacidad insecticida y fungicida que inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma* en un 100% en pruebas *in vitro* y redujeron bajo condiciones controladas, los síntomas de la verticilosis en plantas hasta en un 58.9%.

El grupo de investigación propone a los metabolitos secundarios obtenidos de *M. brunneum* EAMb09/01-Su como una alternativa sustentable para el control de tefrítidos y de los fitopatógenos *V. dahliae* y *P. megasperma* y pueden reducir la dependencia de plaguicidas sintéticos, mejorando la sostenibilidad del cultivo del olivo en España, por lo tanto el grupo de investigación está interesado

profundizar en los estudios a nivel de campo en medianas y grandes extensiones que permitan aprovechar todo el potencial de estos hongos entomopatógenos y definir una estrategia de control integrado menor impacto ambiental y más eficaz contra los insectos y los fitopatógenos radicales del cultivo del olivo

#### 4. Referencias bibliográficas

- Blanco-López, M., López-Escudero, F. 2007. *Verticillium* wilt of olive. *Olea*: 26:58-59.
- Bruck, D. 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *Biocontrol*. 55:103-112
- Daane, KM, Johnson, MW. 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual Review Entomology* 55:151-169
- Haniotakis G, 2005. Olive pest control: Present status and prospects. *IOBC/WPRS Bulletin* 28, 1-9.
- Higgs, R.E., Zahn, J.A., Gygi, J.D., Hilton, M.D. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 371-376.
- Jiménez-Díaz, R.M. Cirulli, M. Bubici, G., Jiménez-Gasco, I.M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C. 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status

- and future prospects for its management. *Plant Disease*. 96: 304-329.
- López, E., Martos, C., Blanco, M. 2003. Análisis y significado epidemiológico de la población de *Verticillium dahliae* en el suelo. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. España. 60p.
- López, E., Martos, C., Blanco, M. 2003. Análisis y significado epidemiológico de la población de *Verticillium dahliae* en el suelo. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. España. 60p.
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J. 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344:1-50
- MAGRAMA, 2014. Guía de Gestión integrada de plagas olivar. Madrid.  
[http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAOLIVAR\\_%282%29\\_tcm7-348111.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/GUIAOLIVAR_%282%29_tcm7-348111.pdf).
- Ortiz-Urquiza A, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C, Quesada-Moraga E. 2009. Purification and characterization of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*. 65: 1130-1139
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal Invertebrate Pathology*. 105: 270-278.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal Invertebrate Pathology*. 98:267-270
- Ownley, B., Gwinn, K., Vega, F. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55: 113-128.
- Quesada-Moraga E., Vey, E. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycology Research* 108: 441-452.
- Quesada-Moraga, E. Alvarez-Santiago, C. 2008. Hongos entomopatógenos. En: Control biológico de plagas agrícolas. Jacas, J.A., Urbaneja, A. (eds). Phytoma España. 98-120 pp.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J., Marahao, E., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*. 111: 947-966.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Álvarez-Santiago, C. 2006. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal Economic Entomology*. 99:1955-1966.
- Sánchez-Hernández, M.E., Muñoz-García, M., Brasier, C.M., Traperó-Casas, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root

- disease of olive trees. *Plant Disease*. 85: 411–416.
- Sánchez-Hernández, E., Ruiz-Davila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M.A., Trapero-Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of Young olive trees in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 104: 347–357.
- Sánchez-Hernández, M.E., Ruiz-Dávila, A., Trapero-Casas, A. 1997. First report of *Phytophthora megasperma* and *Pythium irregulare* as olive tree root pathogens. *Plant Disease* 81: 1216.
- Sarabia F, Chammaa S, Sanchez A, Martin L, Lopez F, 2004. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 1309-1332.
- Topuz, H., Durmusoglu, E. 2008. The effect of early harvest on infestation rate of *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) as well as yield, acidity and fatty acid composition of olive oil. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 115: 186-191.
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vega, F., Posada, F., Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46, 72–82.
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. Butt, T., Jackson C., Magan, N. (Ed.). CABI publishing. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn UK. 311-346 pp.
- Yousef, M., Lozano-Tovar, MD., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2013. Biocontrol of *Bactrocera Oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology*. 106: 1118-1125.

## ABSTRACT

### **Entomopathogenic fungi and their molecules for the control of Tephritids (Diptera: Tephritidae) and their effect on soil-borne pathogens of olive.**

This Doctoral Thesis gathers three researches focus on finding effective and feasible alternatives for the control of the phytosanitary problems of olive orchard, through a multidisciplinary approach between the PAIDI AGR 163 Group "Agricultural Entomology" of department of Sciences, Agricultural, and Forestry Resources and the PAIDI AGR 216 group "Pathology Agroforestry" of Department of Agronomy, University of Córdoba Spain. The current Doctoral Thesis explores if the entomopathogenic fungi (EF) applied in the soil for the control of preimaginal tephritids stages could impact on other soil-borne microorganism communities, such as fungal plant pathogens. The EF can be antagonist of olive pathogens. Besides, the work examines the possible dual biocontrol of both olive pests and diseases with EF, which would be a new strategy for the integrated management control of pest and disease in the olive orchard.

The olive *Olea europaea* L. (Oleaceae) is an important crop in many countries and has acquired a large socio-economic importance within the Mediterranean region. The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin) and the olive pathogens *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora inundata* are major worldwide limiting factors for olive tree production, they are causing the Verticillium wilt and root rot diseases, respectively. Although EF *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. are well-known for insect pest control for many years, and in particular, for olive fly control by either targeting adults or pupariating larvae and puparia in the soil beneath the tree canopy, additional roles in nature have also been recently discovered, such as endophytic and rhizospheric interactions with plants, antagonism to plant

pathogens, induction of systemic resistance, plant growth promotion and the enhancement of nutrient intake and the yield of plants. Therefore, the goal of the present work is to explore the potential antagonistic activity of several strains of the EF *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp., selected for their virulence toward tephritid puparia against the olive soil-borne pathogens *V. dahliae* and *Phytophthora* spp., and to elucidate their possible mechanisms of antagonism.

In the work the “Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive”, twelve indigenous isolates of *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae* and two isolates of *Metarhizium brunneum* from olive crops (soil and phylloplane) were evaluated in soil treatments against medfly (*Ceratitis capitata* Wied.) pre-imaginals. The strains EAMa 01/58-Su of *M. brunneum* and EABb 09/16-Su of *B. bassiana* were evaluated for antifungal activity against two strains of *V. dahliae* (V117, V004), one of *P. megasperma* (PO20), and one of *P. inundata* (PO47) with one strain of *Trichoderma atroviride* used as a reference in the antagonism assays. In the dual plate culture assays, *T. atroviride* caused a 64–79% inhibition of *Phytophthora* spp. and *V. dahliae* mycelial growth. Meanwhile, the mycelial growth inhibition rates of *M. brunneum* and *B. bassiana* were 42–62% for *Phytophthora* and 40–57% for *V. dahliae*, with both entomopathogens causing inhibition halos, supporting the mechanism of antibiosis. Such a mechanism is also supported by the inhibitory activity of the crude extracts of these two *M. brunneum* and *B. bassiana* strains against these olive pathogens. Also, after the dialysis of the crude extracts against water in a molecular porous membrane with a cut-off of 3500 Da, the antifungal activity was mostly retained (100% inhibition rates) in the dialyzed fractions, indicating that the active compounds were secondary metabolites.

Likewise, these dialyzed fractions inhibited the germination of conidia (96–100%) and microesclerotia (58–96%) of *V. dahliae* and propagules of *P. megasperma* (38–100%). These results indicate that EF have the potential for dual biocontrol of olive soil pests and diseases.

The second research “Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)”. We present quite original findings about the potential of the EAMb 09/01-Su strain of *M. brunneum* as a source of insecticidal compounds of natural origin for fruit fly control. We show the optimization of the purification process of its crude extract, whose insecticidal activity falling on A- and A2-destruxin content. The crude extract of seven *Metarhizium* and one *Beauveria* isolates were evaluated per os against medfly adults. The crude extracts of the isolate EAMb 09/01-Su resulted in mortality ranging between 95 and 100% at 48 h. The high-pressure liquid chromatography profile showed two active peaks (F5B and F6 subfractions) related with dtx A2 and dtx A, which caused 70 and 100% mortality on *C. capitata* at 48 h postfeeding, respectively. The LC<sub>50</sub> was 104.92 ppm of dtx A, contained in the F6 subfraction, and the LT<sub>50</sub> was 4.16h at a concentration of 400 ppm of dtx A contained in the F6 subfraction. Moreover, the average survival time of adults exposed to this subfraction was 12.6h with only 1h of exposure. The insecticide metabolites of the F6 subfraction of the EAMb 09/01-Su isolate retained >90% of its insecticidal activity after exposure to 60°C for 2h and 120°C for 20min.

In the work “*Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens”, the antifungal activity of the EF isolates *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su against the olive pathogens *V. dahliae* and *P. megasperma* was studied. Our

results showed that the crude extract, aqueous chloroform and the methanol fractions of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su inhibited the mycelial growth of *V. dahliae* and *P. megasperma* 100%, while the same fractions of *B. bassiana* EABb 09/16-Su inhibited the mycelial growth of *V. dahliae* 100% and the mycelial growth of *P. megasperma* 100%, 46.7% and 25.2%, respectively. These results suggest that *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su strains are not only pathogenic to insects but also possess antifungal properties. When methanol fractions obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su were evaluated over the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber conditions, the fraction obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su exhibited clear antagonism against *V. dahliae*, reducing the disease in the infected plants. Both the mean progress of the disease severity (0-4) and the cumulative area under the disease progress curve in the methanol fraction treatment were lower than in the other treatments, reducing the disease severity and the disease progress between 38.9 and 40.8%.

This Doctoral Thesis shows that the secondary metabolites with antifungal activity obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su represent an alternative for achieving a sustainable control of *B. oleae*, *V. dahliae* and *P. megasperma* and it could be include in Integrated Pest Management programs. They can reduce the dependence on synthetic pesticides, improving the sustainability of olive orchard in Spain. These novel findings should be tested at field level to benefit of the full potential of these EF and define an environmental friendly integrated strategy control and more effective against insects and pathogens of olive orchard.

# ÍNDICE

	<b>Pag.</b>	
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.</b>	<b>EL OLIVO Y SUS PRINCIPALES PATÓGENOS RADICULARES</b>	3
1.1.	Importancia del cultivo del olivo	3
1.2.	Morfología y taxonomía del olivo	5
1.2.1.	Generalidades	5
1.2.2.	Morfología.	7
1.2.3.	Taxonomía.	9
1.3.	Los principales patógenos radiculares del olivo	9
1.3.1.	Características de <i>V. Dahliae</i>	10
1.3.1.1.	La Verticilosis del olivo	14
1.3.1.2.	Factores determinantes de la distribución de la Verticilosis en el olivar	15
1.3.2.	La podredumbre radical del olivo	17
1.4.	Referencias bibliográficas	21
<b>2.</b>	<b>PROBLEMÁTICA DE LOS TEFRÍTIDOS EN EL MUNDO</b>	27
2.1.	Generalidades.	27
2.2	Especies de mayor incidencia en fruticultura	28
2.2.1.	<i>Bactrocera oleae</i> “mosca del olivo	28
2.2.2.	<i>Ceratitis capitata</i> “mosca mediterránea de la fruta	33
2.2.3.	<i>Anastrepha</i> spp.	34
2.3	La lucha biológica contra las principales moscas de la fruta en el mundo.	34
2.3.1.	Uso de parasitoides para el control de moscas de las frutas	36
2.3.2.	Uso de microorganismos entomopatógenos para el control de las moscas de las frutas	39
2.3.2.1.	Los hongos entomopatógenos y sus compuestos activos para el control de las moscas de las frutas.	43
2.3.2.1.1.	Posición sistemática	44
2.3.2.1.2.	Los ascomicetos mitosporicos entomopatógenos	46
2.3.2.1.3.	Modo de acción	46
2.3.2.1.4.	Ascomicetos mitosporicos entomopatógenos y control de tefritidos	51
2.3.2.1.4.1.	Los extractos secretados por los Ascomicetos mitosporicos entomopatógenos y control de tefritidos.	53
2.3.2.1.4.1.1.	Importancia de la producción de enzimas entomopatógenas en el control de insectos.	54



		<b>Pag.</b>
2.3.2.1.4.1.2.	Metabolitos secundarios producidos por los hongos entomopat6genos en el control de insectos	56
2.4.	Referencias bibliogr6ficas	66
<b>3.</b>	<b>LOS MICROORGANISMOS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES.</b>	77
3.1.	Mecanismos de acci3n de los microorganismos antagonistas.	78
3.2.	Microorganismos m6s utilizados para el control de enfermedades en plantas.	81
3.3.	Importancia de las enzimas y los metabolitos secundarios de origen microbiano para el control de fitopat6genos.	85
3.4.	Los hongos entomopat6genos y sus metabolitos en el control de microorganismos fitopat6genos	91
3.5.	Referencias bibliogr6ficas	96
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACI3N Y OBJETIVOS.</b>	103
<b>1.</b>	<b>JUSTIFICACI3N.</b>	105
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	107
<b>III</b>	<b>INVESTIGACIONES REALIZADAS.</b>	109
<b>1</b>	<b>ASSESSMENT OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND THEIR EXTRACTS AGAINST A SOIL-DWELLING PEST AND SOIL-BORNE PATHOGENS OF OLIVE.</b>	111
	Abstract.	
1.	Introduction.	
2.	Materials and methods.	
2.1.	Insects.	
2.2	Fungal isolates.	
2.3.	Inoculum production of entomopathogenic fungi.	
2.4.	Effects of entomopathogenic fungi on <i>C. capitata</i> pre-imaginals and adults.	
2.5.	Effects of entomopathogenic fungi on mycelial growth of <i>V. dahliae</i> and <i>Phytophthora</i> spp.	
2.6.	Effects of extracts of entomopathogenic fungi on mycelial growth of <i>V. dahliae</i> and <i>Phytophthora</i> spp.	
2.7.	Effects of dialyzed fractions from	

- entomopathogenic fungi crude extracts on the germination of propagules of *V. dahliae* and *P. megasperma*.
- 2.8 Statistical analysis
3. Results.
- 3.1. Effects of entomopathogenic fungi on pre-imaginals and adults of *C. capitata*.
- 3.2. Effects of entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp.
- 3.3. Effects of crude extracts and dialyzed fractions from entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp
- 3.4. Effects of crude extract and dialyzed fractions from entomopathogenic fungi on the germination of propagules of *V.dahliae* and *P. megasperma*.
4. Discussion
- Acknowledgments
- References
- 2. INSECTICIDAL ACTIVITY OF A DESTRUXIN-CONTAINING EXTRACT OF *Metarhizium brunneum* AGAINST CERATITIS CAPITATA (DIPTERA: TEPHRITIDAE).**
1. Abstract.
2. Materials and methods.
- 2.1. Entomopathogenic Fungi
- 2.2. Insects.
- 2.3. Production of Fungal Crude Extracts in a Liquid Medium.
- 2.4. Insecticidal Activity of Crude Extracts.
- 2.5. Obtaining of Fractions and Their Insecticidal Activity.
- 2.6. Purification and Structural Elucidation of the Active Compounds
- 2.7. Biological activity of the Selected Fraction
- 2.8. Comparative Analysis of Insecticidal Activity of both EAMb 09/01-Su Crude Extract and the F6 Sub-Fraction with Reference Strain.
- 2.9 Statistical Analyses
3. Results
- 3.1. Insecticidal Activity of the Crude Extracts.
- 3.2. Insecticidal Activity of Fractions Obtained of EAMb 09/01-Su Isolate.
- 3.3. Purification and Structural Elucidation of the Active Compounds of EAMb 09/01-Su Crude

- Extract.
- 3.4. Chronic and Acute Biological Activity of the purified Active Compounds Against Newly Emerged *C. capitata* Adults.
- 3.5. Effect of Temperature on the Insecticidal Activity of the Fractions Produced by the EAMb 09/01-Su Strain.
- 3.6. Comparative Analysis of Insecticidal Activity of Both the EAMb 09/01-Su Crude Extract and the F6 Subfraction with the Reference Strains.
4. Discussion.  
Acknowledgments.  
References Cited.
- 3. *Metarhizium brunneum* AND *Beauveria bassiana* RELEASE SECONDARY METABOLITES WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *Verticillium dahliae* AND *Phytophthora Megasperma* OLIVE PATHOGENS.**
- Abstract.
1. Introduction.
2. Materials and methods.
- 2.1. Fungal isolates.
- 2.2. Evaluation of crude extracts and their organic fractions against *V. dahliae* and *P. megasperma*
- 2.3. Partial purification of metabolites with antifungal activity obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and their effectiveness against *V. dahliae*.
- 2.4. Standardization of soil infestation with inoculum of *V. dahliae*
- 2.5. Effects of the methanol fraction of *M. brunneum* and *B. bassiana* on the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber.
- 2.6. Effects of three applications of the H<sub>2</sub>O-MeOH fraction of *M. brunneum* on the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber.
- 2.7. Evaluation of the temperature, UV light and pH on fungicide activity of the dialyzed fraction from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su.
- 2.8. Statistical analysis.
3. 3. Results.
- 3.1. Evaluation of crude extracts and their organic

	fractions against <i>V. dahliae</i> and <i>P. megasperma</i> .	
3.2.	Antifungal activity of partial purified fractions from <i>M. brunneum</i> EAMb 09/01-Su.	
3.3.	Standardization of soil infestation with inoculum of <i>Verticillium dahliae</i> .	
3.4.	Effect of the H <sub>2</sub> O-MeOH fractions from the entomopathogenic fungi <i>M. brunneum</i> EAMb 09/01 Su and <i>B. bassiana</i> EABb 09/16-Su on the progress of <i>Verticillium</i> wilt of cotton in a growth chamber.	
3.5.	Effect of three applications of the H <sub>2</sub> O-MeOH fraction of <i>M. brunneum</i> on the progress of <i>Verticillium</i> wilt of cotton in a growth chamber.	
3.6.	Effect of the temperature, UV light and pH on fungicide activity of the dialyzed fraction from <i>M. brunneum</i> EAMb 09/01-Su.	
4.	Discussion.	
.	Acknowledgments.	
.	References.	
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	173
<b>1.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	175
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	185
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	189
<b>VI</b>	<b>MEMORIA FOTOGRÁFICA</b>	193

# ÍNDICE DE TABLAS

Pag.

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Grupos de destruxinas y referencias relacionadas con su bioactividad.

62

## III. INVESTIGACIONES REALIZADAS

### 1. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive.

**Tabla 1.** Entomopathogenic fungal isolates assayed against *Ceratitis capitata* puparia.

**Tabla 2.** Inhibition of mycelial growth of *Phytophthora megasperma*, *P. inundata* and *Verticillium dahliae* grown on PDA medium in dual cultures with several antagonistic fungi.

**Tabla 3.** Inhibition of mycelial growth of four plant pathogenic isolates grown on PDA medium amended with crude extracts of *Trichoderma atroviride* and of the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* (EAMa 01/58-Su) and *Beauveria bassiana* (EABb 09/16-Su).

**Tabla 4.** Inhibition of mycelial growth of four plant pathogenic isolates (two isolates of *Verticillium* and two isolates of *Phytophthora*) grown on PDA medium amended with dialyzed and adialyzed fractions of the crude extract from *Beauveria bassiana* EABb 09/16-Su and *Metarhizium brunneum* EAMa 01/58-Su isolates.

**Tabla 5.** Table 5. Effect of the dialyzed fractions of entomopathogenic fungi on the germination of propagules of *Phytophthora megasperma* (isolate PO20) and *Verticillium dahliae* (isolates V004, V117).

### 2. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

**Tabla 1.** Entomopathogenic fungal isolates assayed against *C. capitata* adult.

**Tabla 2.** Linear regression (Log-dose).

- Tabla 3.** Acute activity of the F6 subfraction from the crude extract of the EAMb 09/01-Su strain assayed at 400 ppm dtx A against newly emerged *C. capitata* adults.
- Tabla 4.** Effect of temperature treatments on the insecticidal activity of the two active subfractions of the EAMb 09/01-Su crude extract against newly emerged *C. capitata* adults.
- Tabla 5.** Table 5. Acute mortality percentage (mean  $\pm$  SE) and AST of newly emerged *C. capitata* adults exposed to the crude supernatant of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate and the ARSEF 23 and BIPESCO5 reference strains.
- Tabla 6.** Table 6. Linear regression (Log-time), lethal time and AST of newly emerged *C. capitata* adults exposed to the active F6 subfraction of both the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate, ARSEF 23 reference strain, and standard dtx A.

### **3. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens.**

- Tabla 1.** Fungicide test of the fractions obtained of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su through dialysis and column chromatographic (mean  $\pm$  SE).
- Tabla 2.** Evaluation of the semi-pure H<sub>2</sub>O:MeOH (7:3 v/v) fraction of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su against *Verticillium dahliae* microsclerotia germination in naturally and artificially infested soils (microsclerotia/g of soil  $\pm$  SE).
- Tabla 3.** Effect of the temperature, UV light exposure, and pH on fungicidal activity of the dialyzed fraction from *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su (mean  $\pm$  SE).

# ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Figura 1.</b>	Morfología del árbol del olivo. 9
<b>Figura 2.</b>	Estructuras de <i>Verticillium dahliae</i> y efectos sobre tejidos vegetales. 11
<b>Figura 3.</b>	Ciclo biológico de <i>Verticillium dahliae</i> . 12
<b>Figura 4.</b>	Síntomas y estructuras de <i>Phytophthora</i> spp. 18
<b>Figura 5.</b>	Adultos de moscas de las frutas y daños en fruta. 28
<b>Figura 6.</b>	La mosca del olivo. 30
<b>Figura 7.</b>	Parasitoides de moscas de las frutas. 39
<b>Figura 8.</b>	Clasificación sistemática de los Hongos Entomopatógenos. 48
<b>Figura 9.</b>	Modo de acción de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno. 49
<b>Figura 10.</b>	Larvas y adultos de insectos afectados por hongos entomopatógenos. 50
<b>Figura 11.</b>	Adultos y puparios de <i>C. capitata</i> micosados por <i>Metarhizium brunneum</i> y <i>Beauveria bassiana</i> . 52
<b>Figura 12.</b>	Estructura de las destruxinas A-E. 63
<b>Figura 13.</b>	Antibiosis de los microorganismos antagonistas. 80

## III. INVESTIGACIONES REALIZADAS

### **1. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive.**

<b>Figura 1.</b>	Pathogenicity of <i>Beauveria</i> sp. and <i>Metarhizium brunneum</i> strains to <i>Ceratitis capitata</i> pre-imaginals and adults in soil treatment bioassay.
<b>Figura 2.</b>	Interactions between colonies of antagonistic and plant pathogenic fungi.
<b>Figura 3.</b>	Entomopathogenic fungi covering the mycelial growth of plant pathogenic.

**Figura 4** Linear regression of the percentage of inhibition of mycelial growth of four olive pathogens over the logarithm of the dose of the dialyzed extract from *Beauveria bassiana*.

**Figura 5** Linear regression of the percentage of inhibition of mycelial growth of four olive pathogens over the logarithm of the dose of the dialyzed extracto from *Metarhizium brunneum*.

## **2. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).**

**Figura 1.** Activity of the crude supernatant of the entomopathogenic fungal isolates on *C. capitata* adults (mean  $\pm$  SE).

**Figura 2.** Evaluation of fractions obtained of the crude extract of EAMb 09/01-Su isolate against *C. capitata* adults (mean  $\pm$  SE).

**Figura 3.** Mortality percentage of *C. capitata* caused by fractions of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate obtained by silica gel column chromatography.

**Figura 4** The HPLC profile of the EtOAc:2-propanol fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and its evaluation.

## **3. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens**

**Figura 1.** Effect of the aqueous chloroform and methanol fractions of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su against the mycelial growth of *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma*.

**Figura 2.** Evaluation of the crude extract obtained of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su and its organic fractions against the mycelial growth of *P. megasperma* and *V. dahliae*.

**Figura 3.** Evaluation of the crude extract obtained from *Beauveria bassiana* EABb 09/16-Su



- and its organic fractions against the mycelial growth of *Phytophthora megasperma* and *Verticillium dahliae*.
- Figura 4.** Disease severity in eggplant (*Solanum melongena* var. *esculentum* cv. “Black Beauty”) and cotton (*Gossypium hirsutum* cv. “Coko”) inoculated with different levels of inoculum of isolates V004 and V117 of *Verticillium dahliae* and two growth conditions (growth chamber and greenhouse).
- Figura 5.** Effect of the methanol fraction obtained from entomopathogenic fungi *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su on the severity of *Verticillium* wilt of cotton in a growth chamber.
- Figura 6.** Effect of the H<sub>2</sub>O-MeOH (7:3 v/v) fraction obtained from the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su on the severity of *Verticillium* wilt of cotton in a growth chamber.
- Figura 7.** Effect of the dialyzed fraction of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01 Su on hyphal growth and microsclerotial colonies of *V. dahliae*.

A background image of an olive grove with rows of olive trees under a bright sky. The text is overlaid in the center.

# I. INTRODUCCIÓN

# 1. EL OLIVO Y SUS PRINCIPALES PATÓGENOS RADICULARES

## 1.1. Importancia del cultivo del olivo

El cultivo del olivo registra más de 11 millones de hectáreas distribuidas en 47 países de los cinco continentes. El aceite de oliva es un alimento que se consume en más de 160 países. El sector tiene un marcado carácter social, del aceite viven más de 30 millones de personas en todo el mundo, generando unos 46 millones de jornales en cada campaña (Besana, 2014).

El aceite de oliva tiene un peso importante en la economía de la UE con un 1,75% de la Producción Final Agraria (P.F.A.) de la UE, aportando los países mediterráneos el 97,8%. España se sitúa en el primer lugar mundial en superficie y producción de aceite de oliva. La producción española representa aproximadamente el 60% de la

producción de la UE y el 45% de la mundial, con una comercialización media de 1.215.798 toneladas al año, con un récord de 1.615.000 t en la campaña 2011/12. Es importante destacar que en el último decenio, la producción se ha incrementado un 23%, lo que refleja la gran importancia que tiene el sector en España (MAGRAMA, 2014a).

La comercialización del aceite de oliva en España está repartida entre el mercado nacional y el exterior, aunque con una tendencia al crecimiento de las exportaciones durante los últimos años. El aceite de oliva, ocupa el cuarto lugar entre los productos agroalimentarios exportados desde España, solamente por detrás de los cítricos, el vino y la carne de porcino. Las exportaciones representan el 60% del comercio total del aceite de oliva en España, con más de 100 países

de destino (MAGRAMA, 2014a). En los últimos años destaca la tendencia al incremento de las exportaciones de aceite de oliva envasado. Andalucía es el principal productor de aceite de oliva español, produce el 83% del aceite español y el 32% del aceite mundial, y sus olivares ocupan el 9% de la superficie agraria en España y el 40% de Andalucía (Esencia del olivo, 2014).

Igualmente España es líder mundial en producción y exportación de aceituna de mesa. La producción española representa aproximadamente el 71% de la producción de la UE y el 22% de la mundial. La producción media de las últimas seis campañas (2008/09-2013/14) ha sido de 518.2005 t., de las cuales, el 70% aproximadamente se destina para su consumo como aceituna verde y el resto para aceituna negra. La producción media en la última década (2004-2013) se ha

incrementado en un 57% respecto a la media de la anterior (1994-2003), pasando de 330.057 a 516.919 toneladas. El olivar de aceituna de mesa se localiza mayoritariamente en Andalucía con más del 80% y Extremadura con el 18% (MAGRAMA, 2014b).

Además en los últimos años se ha incrementado el interés por las propiedades nutraceuticas de este árbol como la producción de compuestos polifenólicos y antioxidantes que vienen siendo estudiadas en el aceite, fruto, y hojas (Altarejos et al., 2005, Silva et al., 2006, Ferreira et al., 2007, De Leonardis et al., 2008, Fares et al., 2011, Lafka et al., 2013, Kishikawa, et al., 2015). El aceite virgen de oliva es un producto importante en la dieta mediterránea, registra altos contenidos de antioxidantes naturales, algunos de los cuales son exclusivos de las plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae* (De la Torre-Carbot et al., 2005).

Varios estudios (Benavente-Garcia et al., 2000, Soler et al., 2000, Lee-Huang et al., 2003, Cardoso et al., 2005) muestran también propiedades medicinales de los extractos de las hojas del olivo como antivirales, antiinflamatorios y en prevención de enfermedades cardiovasculares.

Es importante también mencionar el uso del aceite de olivo en cosmetología. Históricamente el aceite de oliva ha sido usado como bálsamo tonificante hidratante y reparador de la piel, las cutículas y el cabello. En la antigua civilización egipcia era usado como elemento básico entre las clases más altas como parte de perfumes, ungüentos y baños. En la antigua Grecia y Roma se frotaban con bálsamos de aceite de oliva a los atletas de los juegos olímpicos y luchadores para tonificar su musculatura y prepararla para la actividad física. En el imperio romano se masajeara a los luchadores, gladiadores y

guerreros con aceite de oliva. Galeno en el siglo II d.C. fabricó la primera crema hidratante con base de aceite de oliva, agua y cera de abejas. El yacimiento arqueológico de Pyrgos en Chipre da muestra del uso de Aceite de Oliva en perfumería y cosmética desde hace más de 4000 años (Nomikos et al., 2010). Actualmente se registran comercialmente varios productos a base de aceite para el cuidado del cabello y la piel (Verallo-Rowel et al., 2008, Semalty et al., 2010, Badiu et al., 2010, Rodrigues et al., 2015). Además con la madera se hacen tallas y se usa para ebanistería, combustible y carbón vegetal.

## **1.2. Morfología y taxonomía del olivo**

### **1.2.1. Generalidades**

El olivo (*Olea europaea* Linnaeus), es un árbol de la familia de las oleáceas. Su nombre deriva del termino latino "oleum" que significa "aceite". Su cultivo se inició

en la región del Asia Menor hace más de seis mil años. A lo largo del tiempo se ha extendido por los países de la cuenca del mediterráneo y fue llevado a América por los españoles. El cultivo del olivo está íntimamente vinculado con la cultura mediterránea. Ávila y Fernández (2009), plantean *“El legendario árbol del olivo y el aceite obtenido de sus frutos han acompañado, desde el principio, la historia de todas las culturas que se han desarrollado en la cuenca mediterránea”*. Los estudios en fósiles de polen y hojas indican que el olivo apareció en la cuenca mediterránea hace más de 3.2 millones de años en el periodo terciario, los hallazgos de madera carbonizada en Alicante (España), muestran la presencia del olivo en España en el periodo Neolítico (8000-2700 A. C) (Ávila y Fernández, 2009). Los ejemplares añejos, muchas veces centenarios, procedentes de antiguas

plantaciones aceituneras, son utilizados en la actualidad con fines ornamentales, pueden vivir más de 1.500 años (International olive council, 2015).

La especie es anemófila (polinización por medio del viento) y parcialmente auto-compatible. Por lo tanto se recomienda la polinización cruzada y la colocación de árboles polinizadores. La variedad polinizadora debe cumplir varios requisitos como la sincronización de la floración con la variedad principal, además debe producir abundante polen de buena calidad y que sea compatible, sus frutos deben tener importancia comercial para aceite o mesa. Para lograr una polinización efectiva, la distancia máxima entre el polinizador y la variedad principal en el sentido del viento dominante no debe superar los 40 m y se necesitan alrededor de un 10% de

árboles polinizadores en una plantación (Pinillos y cuevas, 2009).

El olivo es una especie vecera (alternancia de cosecha). A una abundante cosecha precede a otra con escasa floración, debido a la inhibición de la inducción floral de la cual es responsable la semilla en desarrollo. Esta última emite giberelinas que hacen que las yemas se queden en estado latente o que broten como vegetativas. Ahora bien, con una cuidadosa recolección, con riego y con una fertilización equilibrada la vecería puede reducirse en gran medida. Su hábitat está determinado por el clima mediterráneo que se caracteriza por inviernos suaves y veranos secos y calurosos. Las áreas pertenecientes a este tipo de clima se localizan entre los paralelos 30° y 45° de ambos hemisferios. Tiene alta adaptación a suelos pobres y calcáreos (Pinillos y cuevas, 2009).

### **1.2.2. Morfología**

El olivo cultivado es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 m de altura según la variedad. Puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La forma del árbol está influida en gran medida por las condiciones agronómicas y ambientales durante su crecimiento y, en particular, por el tipo de poda. El olivo demuestra una gran plasticidad morfo-genética. Es un árbol polimórfico con fases juvenil y adulta. Las diferencias entre estas fases se manifiestan en la capacidad reproductora, solamente en fase adulta, en el potencial para el enraizamiento que es mayor en la fase juvenil y en la morfología de hojas y ramas.

El sistema radicular es una raíz pivotante que se ramifica abundantemente, tiene hojas lanceoladas, decusadas y coriáceas.

El haz de la hoja de olivo es generalmente de color verde-oscuro brillante debido a la existencia de una cutícula gruesa que le permite adaptarse a períodos prolongados calurosos y con escasas precipitaciones. El envés está cubierto por abundantes pelos aparasolados que le confieren un color blanco-plateado (Fig. 1). La inflorescencia del olivo es una panícula, que posee un eje central del cual salen ramificaciones que a su vez también pueden ramificarse. Las flores son perfectas (masculinas con distintos grados de desarrollo del pistilo). Especie andromonóica, lo cual es un carácter varietal y nutritivo (el factor limitante es el agua). Flores gamopétalas con cuatro pétalos blancos y dos anteras, dispuestas en inflorescencias que salen de las axilas de las hojas de los ramos fructíferos (ramos de un año de edad). Ovario con cuatro óvulos y

estilo muy corto. En las semanas posteriores a la floración tiene lugar la caída de flores y pequeños frutos, de forma que el cuajado es del 1-2%. El fruto o drupa es muy oleoso, con de 1 a 3,5 cm. de largo. Inicialmente es de color verde y luego se vuelve negro vinoso (Fig. 1). La aceituna u oliva tiene los siguientes componentes químicos agua 50 – 60%, aceite 22%, azúcares 19,1%, celulosa 5,8%, proteínas 1,6% y cenizas 1,5%, el aceite virgen de oliva esta compuesto por ácido oleico en 55%, ácido linoleico entre un 5,3- 15,0% entre otros. Los ácidos grasos saturados están entre 12.6-19.7%, los ácidos grasos monoinsaturados entre un 64,4- 81% y los poliinsaturados entre 6,0-15,9%, estas características convierten al aceite de oliva virgen en un excelente alimento (Ávila y Fernández, 2009, Maggio et al., 2009).



### 1.2.3. Taxonomía

La especie genérica *Olea europaea* tiene seis subespecies, donde se agrupan los individuos de caracteres morfológicos semejantes entre los cuales están *O. europea* subsp. *europaea*, *O. europaea* subsp. *europaea* var. *Silvestris*, *O. europaea* subsp. *cuspidata*, *O.*

*europaea* subsp. *guanchica* *O. europaea* subsp. *maroccana* *O. europaea* subsp. *laperrinei*.

**Nombre Común:** Olivo, Olivera, Aceituno

**Nombre Científico:** *Olea europaea*.

**Familia:** Oleáceas

**Clase:** Angiospermas dicotiledóneas



**Figura 1.** Morfología del árbol del olivo. (1), Árbol desarrollado. (2), Inflorescencias. (3), Flores. (4), Aceitunas. (5), Hojas lanceoladas.

### 1.3. Los principales patógenos radiculares del olivo

La producción del olivo se ve afectada por hongos radiculares

como *Verticillium dahliae* Kleb, *Phytophthora megasperma* Drechsler y *Phytophthora inundata* Brasier. Se calcula que un 30% del olivar Andaluz está afectado por

Verticilosis y en la actualidad no existe un método eficaz para su control, por lo cual se requiere un enfoque integral para el manejo fitosanitario del cultivo (Sánchez-Hernández et al., 2001, Jiménez-Díaz et al., 2012).

### **1.3.1. Características de *V. dahliae***

*V. dahliae* es el agente causal de la enfermedad de las plantas llamada Verticilosis, se encuentra ampliamente distribuido en todos los países de la cuenca mediterránea. La especie fúngica *V. dahliae* se clasifica actualmente en el reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, sub-clase Hypocreomycetidae; orden Incertae sedis, familia Plectosphaerellaceae, género *Verticillium* (EFSA, 2014).

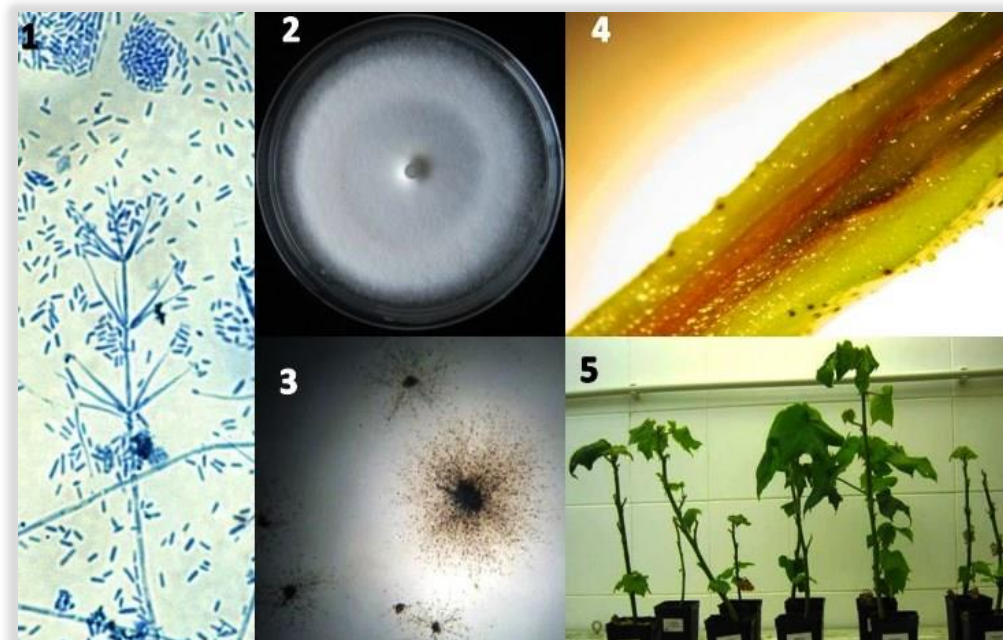
Este patógeno produce marchitez vascular y traqueomicosis en los tejidos de las plantas y se caracteriza por la producción de conidióforos con fiálicas dispuestas

en verticilos y la formación de microesclerocios (Fig. 2), estos últimos constituidos por células compactadas, muy persistentes que pueden durar viables hasta 12 y 14 años (Jiménez-Díaz et al., 2012, Morales-Lizcano y Dobinson, 2013). Los microesclerocios generalmente permanecen inactivos y su germinación es estimulada por los exudados de las raíces en crecimiento, las hifas producidas pueden penetrar a través de heridas o directamente avanzan inter o intracelularmente a través de la epidermis, córtex y endodermis llegando al xilema. En el xilema se produce crecimiento micelial y formación de conidios que son transportados con la savia ascendente. Cuando los síntomas son severos se forman microesclerocios en el xilema y luego en el resto de los tejidos (Jiménez-Díaz et al., 2003, Blanco-López y López-Escudero, 2007). Las hojas caídas de los árboles infestados

constituyen una fuente de inóculo importante, debido a la formación de microesclerocios en éstas en condiciones de alta humedad (Fig 3). El desarrollo de la enfermedad tiene carácter estacional en el año de crecimiento del olivo, la severidad y los síntomas aumentan durante el invierno y primavera y disminuyen en el periodo estival-otoñal (Jiménez-Díaz et al., 2003).

Entre los mecanismos de patogenicidad de *V. dahliae* se

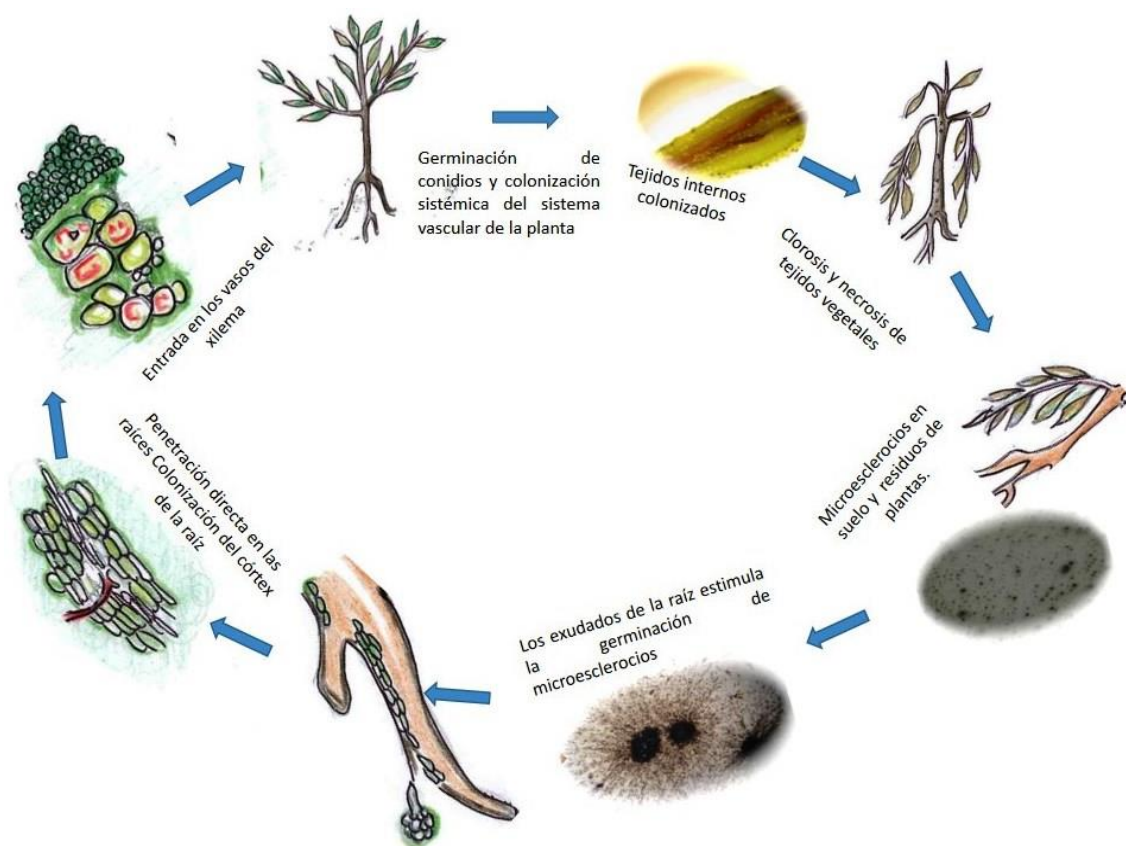
encuentra la producción de enzimas que degradan la pared celular de la planta huésped, entre las cuales están las pectinolíticas (poligalacturonasa, pectato-liasas y pectin-esterasa), que necrosan los tejidos de las plantas. Estudios recientes demuestran que la producción de estas enzimas está altamente correlacionada con el grado de virulencia de las diferentes cepas de *V. dahliae* (Fradin y Thomma, 2006).



**Figura 2.** Estructuras de *Verticillium dahliae* y efectos sobre tejidos vegetales. (1), Fiálida con conidios. (2), Colonia aislada en el medio de cultivo PDA (3), Microesclerocios germinados en el medios específico APSM. (4), Tejidos de algodón afectados por la infección de *V. dahliae*. (5), Síntomas en plantas de algodón infectadas con *V. dahliae* .

De igual forma, estudios con extractos crudos de *Verticillium* han revelado que producen toxinas de alto y bajo peso molecular que inducen la muerte celular en la planta huésped, las toxinas de alto peso molecular están más asociadas a los síntomas de la enfermedad, mientras que la fracción de bajo peso molecular (polipéptidos), tiene respuesta diferencial y está

relacionada con la especificidad del hospedero (Nachmias et al., 1987). En general la resistencia o tolerancia de las plantas se relaciona con la insensibilidad al complejo de toxinas, experimentos de inmunolocalización muestran acumulación de estas toxinas en las paredes celulares de los tejidos del xilema de las plantas susceptibles (Fradin y Thomma, 2006)



**Figura 3.** Ciclo biológico de *Verticillium dahliae*.

La problemática del manejo de *V. dahliae* aumenta debido a su poca especialización patogénica, la gran mayoría de los aislados pueden causar enfermedad en un amplio espectro de géneros y especies vegetales, siendo patógeno tanto de cultivos herbáceos como de especies leñosas y arvenses. Se reconocen alrededor de 200 especies afectadas en la zona templada y subtropical, siendo la gran mayoría de importancia económica (Fradin y Thomma, 2006). Se ha citado en especies como algodón (*Gossypium* spp L.), fresa (*Fragaria* spp L.), patata (*Solanum tuberosum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* Urban) girasol (*Helianthus annuus* L.) tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller), pimiento (*Capsicum annuum* L.), melón (*Cucumis melo* L.), rábano picante (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb), col silvestre (*Brassica oleracea* L.), menta piperita (*Mentha piperita* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.),

soja (*Glycine max* Merrill), coliflor (*Brassica oleracea* Var. *italica* Plenck), entre otros (Pegg, 2002, Gordon et al., 2002, Jiménez-Díaz et al., 2012) *V. dahliae* también ha sido encontrado en frutales de importancia económica como almendro (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) aguacate (*Persea americana* Miller), pistacho (*Pistacia vera* L.), maracuyá (*Passiflora edulis* Sims), vid (*Vitis vinifera* L.), café (*Coffea arabica* L.), cacao (*Theobroma cacao* L.) (Resende et al., 1994, Epstein et al., 2004). La extensa gama de plantas huéspedes le permite aumentar su población en el suelo, facilitando así su persistencia en él (Blanco-López et al., 1984).

Sin embargo, aunque no existe especialización patogénica, sí existen diferencias de virulencia entre aislados del hongo sobre los huéspedes. En especies como el

olivo y algodón se han diferenciado los patotipos defoliantes y no defoliantes en función de que sean capaces o no de causar defoliación y muerte sobre los cultivares susceptibles. El patotipo defoliante fue citado por primera vez en California, y más tarde en Perú, China, Irak, Grecia, Turquía e Israel. Actualmente está distribuido en amplias zonas del sur de España (Jiménez-Díaz, et al., 2012). En Andalucía se han caracterizado los dos grupos de aislados: aislados no defoliantes que inducen síntomas de severidad moderada y aislados defoliantes que causan síntomas severos, defoliación y muerte de la planta, además de aislados de virulencia intermedia que inducen enanismo y muerte de la planta sin defoliación (Jiménez-Díaz, et al., 2011, López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

#### **1.3.1.1. La Verticilosis del olivo**

La Verticilosis es una enfermedad de difícil control debido a la supervivencia del hongo en el suelo y a su ubicación en el xilema de la planta. En los últimos años ha adquirido gran relevancia y es considerada la principal amenaza fitosanitaria para el sector del olivar, debido a su expansión y a los graves ataques observados en Andalucía, donde más del 40% de los olivares están afectados por la enfermedad (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011, Jiménez-Díaz et al., 2012). La enfermedad es más severa en plantaciones jóvenes en el segundo o tercer año de establecimiento, siendo menor la incidencia y severidad en plantaciones más antiguas. En Andalucía los estudios muestran que los ataques de Verticilosis son más frecuentes y severos en árboles de 4-10 años (López-Escudero et al., 2008, López-Escudero et al., 2010).

La Verticilosis se caracteriza por dos tipos de síndromes bien

definidos denominados decaimiento lento (forma crónica de la enfermedad) y apoplejía (forma aguda de la enfermedad). Algunos autores plantean que en olivo la mayoría de los síntomas se presentan en los meses de marzo a junio, siendo menores en verano e invierno, lo cual está condicionado por factores ambientales y por las características del huésped (Montes et al., 1997). La apoplejía consiste en la pérdida de coloración de las hojas, luego se produce secamiento rápido de brotes y ramas que suele comenzar desde las puntas y puede llegar a causar la muerte de los árboles. Las hojas se vuelven de color marrón claro y se voltean hacia el envés, permaneciendo unidas a los brotes. La corteza de las ramas afectadas puede tomar color morado o púrpura, igualmente en los tejidos del xilema se observa una coloración marrón. En árboles jóvenes se produce defoliación. El decaimiento lento suele observarse en primavera:

los síntomas son necrosis y momificado de las inflorescencias, junto con clorosis y necrosis de las hojas. Los frutos que se forman en las ramas afectadas suelen secarse y momificarse. Ambos síntomas pueden ser observados en un mismo árbol (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011, Jiménez-Díaz et al., 2012). Trapero et al. (2011), demostraron que las inflorescencias del olivo pueden ser colonizadas por *V. dahliae*, observándose microesclerocios en los pedúnculos. Estas estructuras son fácilmente descompuestas en el suelo constituyendo una importante fuente de inóculo del patógeno.

#### **1.3.1.2. Factores determinantes de la distribución de la Verticilosis en el olivar**

Dependiendo de la naturaleza de la fuente de inóculo y de los medios de dispersión del patógeno, la enfermedad puede manifestarse inicialmente al azar o en rodales, a la entrada del huerto o a lo largo de

la frontera de campos con cultivos susceptibles a *V. dahliae*, luego puede desarrollarse en forma progresiva dependiendo de las condiciones ambientales, la susceptibilidad de los cultivares de olivo y de la cantidad y virulencia de inóculo en el suelo (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011, Jiménez-Díaz et al., 2012).

La temperatura y la humedad son factores ambientales que afectan el desarrollo de la Verticilosis. La temperatura óptima de crecimiento de *V. dahliae* está entre 23-25°C. Otros autores plantean rangos más amplios entre 21-27°C. Estudios realizados en patata y berenjena han demostrado que la baja humedad en el suelo acelera los síntomas de la Verticilosis (Arbogast et al., 1999). Otros factores que pueden predisponer a las plantas a infección son la excesiva fertilización nitrogenada, lesiones o heridas radicales y la asociación de las

plantaciones de olivo con cultivos hortícolas susceptibles al patógeno (McMahon, 2012).

Estudios realizados en Andalucía muestran que el riego es un factor importante para la dispersión del patógeno y la severidad de las epidemias de la Verticilosis en el olivo. Rodríguez-Jurado et al. (2008), demostraron la presencia de microesclerocios en el agua de riego en 87,5% de los campos analizados. El transporte de material vegetal infectado ayuda también a la dispersión del patógeno a grandes distancias.

En el olivar se han implementado varias estrategias de manejo de la enfermedad, sin embargo por las características de la misma, su eficacia es reducida (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). El control de la enfermedad mediante la aplicación de fungicidas es costoso y con poca o nula eficacia, igualmente las prácticas culturales como la irrigación abundante en la



estación seca o la aplicación de dosis elevadas de sulfato potásico o de nitrógeno, tampoco han ofrecido solución (Marcilla-Goldaracena et al., 2006).

Por tanto, se plantea que las acciones más eficaces y económicas son de carácter preventivo, entre las cuales está el uso de variedades resistentes, establecer plantaciones en suelos que no contengan cantidades de *V. dahliae* potenciales para causar la enfermedad, evitar la proximidad de las plantaciones a cultivos herbáceos susceptibles, utilizar material de plantación certificado libre de *V. dahliae*, realizar fertilizaciones equilibradas teniendo en cuenta dosis, forma y tiempo de aplicación y reducir el potencial de inóculo en el suelo (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

### **1.3.2. La Podredumbre radical del olivo**

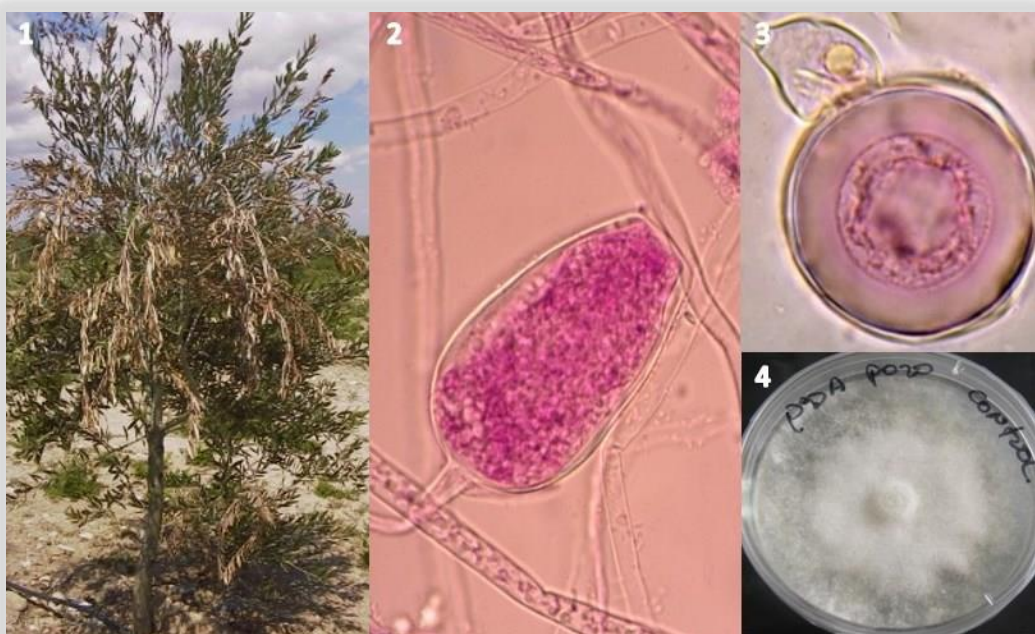
Otra enfermedad que afecta principalmente a olivos jóvenes es la

podredumbre radical asociada a *Phytophthora* spp. (Fig. 4), la cual tiene mayor ocurrencia en suelos arcillosos con tendencia a encharcamiento y puede llegar a ser severa en periodos prolongados de lluvias (Sánchez et al., 1997).

Los agentes causales son los oomicetos *P. megasperma* (Reino: Chromista, Phyla: Oomycota, Clase: Oomycetes, Orden: Pythiales, Familia: Pythiaceae, Genero: Phytophthora) y *P. inundata* (Reino: Chromista, Phyla: Oomycota, Clase: Oomycetes, Orden: Pythiales, Familia: Pythiaceae, Genero: Phytophthora), siendo más frecuente en Andalucía la primera especie con un 65.0% de incidencia (Sánchez et al., 1998). Los olivos adultos son menos afectados, sin embargo en condiciones favorables para la enfermedad puede provocar la muerte de éstos. El patógeno también se ha encontrado en estaquillas y plantones de olivo en vivero (Sánchez et al., 2008). Los

síntomas de la enfermedad son desecación y marchitez generalizada de toda la planta, pérdida de hojas y muerte del árbol. En olivos adultos se ha observado deterioro de la copa con amarillamiento generalizado, además del deterioro radical por la

necrosis del tejido cortical y de las raicilla absorbentes, suelen también presentarse lesiones en el cuello y base del tallo (Fig.4) (Sánchez et al., 2008).



**Figura 4.** Síntomas y estructuras de *Phytophthora* spp. (1), Olivo afectado por *Phytophthora* spp. (2), Esporangio conteniendo zoosporas. (3), Oospora. (4), Colonia de *Phytophthora megasperma* en un medio específico.

Las especies de *Phytophthora* causantes de la podredumbre radical, son patógenos del suelo, capaces de afectar un amplio rango de especies tanto en agricultura

como en ambientes naturales, causando daños económicamente importantes en todo el mundo (Blair et al., 2008). Actualmente, el género consta de aproximadamente 124

especies (Martin et al., 2014). Sus estructuras de supervivencia son las oosporas, las cuales tienen capacidad saprofítica muy baja. Cuando hay niveles altos de saturación de agua y temperaturas entre 10 y 30°C, las oosporas germinan produciendo esporangios que emiten zoosporas móviles. Éstas son atraídas químicamente por los exudados de las raíces, tras la infección se desarrolla la necrosis cortical que aumentan las poblaciones del patógeno. *P. megasperma* también afecta a un gran número de frutales entre los cuales están manzano, vid, kiwi, castaño, ornamentales y varios cultivos herbáceos, espárrago, zanahorias, espinaca, garbanzo, soja, patata y varias especies de *Brassica* (Foster y Coffey, 1993, Baidez et al., 2006). Su desarrollo se ve favorecido por temperaturas alrededor de 21°C, cesando su actividad por encima de 30°C.

*P. inundata* forma esporangios no papilados, que contienen oosporas de paredes gruesas, forma colonias estrellas, es parcialmente heterotalico. Ha sido citado como patógeno de arbustos y árboles en suelos anegados de Europa y América del Sur. Está asociado a las podredumbres de cuello y raíz de plantas ornamentales y hortícolas, ha sido aislado de raíces de alfalfa, tabaco, cítricos y es altamente agresivo en olivos jóvenes (Sánchez-Hernández et al., 2001, Brasier et al., 2003, Parkunan et al., 2010, Safaiefarahani et al., 2013). Su temperatura óptima de crecimiento está alrededor de 30°C y es capaz de seguir activo a los 37°C. Tiene amplia distribución, ha sido encontrado al suroeste de Australia Occidental, en América del Sur, norte de Europa (Reino Unido, Francia, Dinamarca) y en el sur de Europa (España e Italia) (Parkunan et al., 2010).

*P. megasperma* y *P. inundata*, comparten el mismo nicho ecológico que *V. dahliae* generándose interacciones entre ellos lo cual podría contribuir a la severidad de la sintomatología de ambas enfermedades. Estos conviven infectando las raíces del olivo bajo distintas condiciones de temperatura, mostrando bajo nivel de competencia entre ellos.

Las medidas de control de esta enfermedad están enfocadas a crear un ambiente desfavorable para la infección, como disminuir el riesgo de encharcamiento por largos periodos de tiempo, mejorar el drenaje de los suelos y estimular la respuesta defensiva de la planta.

Para esto último son recomendadas las fertilizaciones fosfóricas y sales de calcio. El fosfonato es un fertilizante con función fungicida sistémico, una vez aplicado éste se trasloca a través del floema y del xilema, desplazándose a raíces finas y crecimientos apicales mejorando la producción de fenoles en la planta, mientras que el calcio se acumula en las paredes de la células, mejorando la integridad y funcionalidad de las membranas y pared celular, lo que incrementa la resistencia a la invasión por patógenos y la tolerancia a estreses abióticos (Campanella et al., 2002, Navarro-Cerrillo et al., 2004).

## 1.4. Referencias bibliográficas

- Altarejos, J., Salido, S., Pérez-Bonilla, M., Linares-Palomino, P., Van Beek, T., Nogueras, M., Sánchez, A. 2005. Preliminary assay on the radical scavenging activity of olive wood extracts. *Fitoterapia* 76: 348–351.
- Arbogast, M., Powelson, M.L., Cappaert, M.R., Watrud, L.S. 1999. Response of six potato cultivars to amount of applied water and *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89:782-788.
- Ávila, J., Fernandez, J. 2009. Ayer y hoy del olivo y de la producción de aceite. En: El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. Fernandes-Gutierrez, A., y Segura-Carretero, A. (Eds). Gráficas Urania Málaga. España. 1-35 pp.
- Badiu, D., Luque, R., Rejendram, R. 2010. Effect of olive oil on the skin. In: Olives and olive oil in Health and Disease Prevention. Preedy, V., Watson, R. Eds. Amsterdam. p. 1125-1132.
- Báidez, A.G., Gómez, P., Del Rio, J.A., Ortuño, A. 2006. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm) Scholten. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 224-229.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio J., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*. 68: 457–462.
- Besana, 2014. Aforo del olivar campaña 2013-2014. [http://www.besana.es/sites/default/files/13-10-](http://www.besana.es/sites/default/files/13-10-21_aforo_olivar_2013-2014_rueda_prensa.pdf)
- Blair, JE., Coffey, MD., Park, SY., Geiser, DM., Kang, S. 2008. A multilocus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266-277.
- Blanco-López, M. A., Jiménez-Díaz, R. M., Caballero, J. M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea*. 23:1-8.
- Blanco-López, M., López-Escudero, F. 2007. *Verticillium* wilt of olive. *Olea*: 26:58-59.
- Brasier, C., Sánchez-Hernández, E., Kirk, S. 2003. *Phytophthora inundata* sp. Nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research*. 107: 477-484.
- Campanella, V., Ippolito, A., Nigro, F. 2002. Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Protection* 21: 751-756
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C., Coimbra, M.A. 2005. Characterization of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 21–32.
- De la Torre-Carbort, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A., Lamuela-Raventós, R., López-Sabater, M. 2005. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry. 53: 4331–4340.
- De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., Ranalli, G. 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*. 226: 653–659.
- Efsa. 2014. Scientific opinión on the pest categorisation of *Verticillium dahliae* Kleb. 12: 3928.
- Epstein, L., Beede, R., Kaur, S., Ferguson, L. 2004. Rootstock effects on pistachio trees grown in *Verticillium dahliae*-infested soil. *Phytopathology* 94: 388–395.
- Esencia del olivo. 2014. Aceite de oliva en España. <http://www.esenciadeolivo.es/aceite-de-oliva/aceite-de-oliva-en-espana/>.
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S., Abdel-Massih, R.M. 2011. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66: 58–63.
- Ferreira, I., Barros, L., Soares, M., Bastos, M., Pereira, J. 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103: 188–195
- Forster, H., Coffey, M. 1993. Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphisms. *Mycological Research* 97: 1101–1112.
- Fradin, E., Thomma B. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-trum*. *Molecular plant pathology*. 7:71–86.
- International olive council. 2015. El olivo desde el siglo XX hasta el XXI. *Livae*. 121: 7–18
- Jiménez-Díaz, R., Rodríguez-Jurado, D., Navas-Cortés, J., Traperó-Casas, J., Mercado-Blanco, J. 2003. Estrategias de control de la verticilosis del olivo: *Vida Rural*. 176: 36–40.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, I.M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C. 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant Disease* 96: 304–329.
- Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M., Navas-Cortés, J.A. 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* 101:304–315.
- Kishikawa, A., Ashour, A., Zhu, Q., Yasuda, M., Ishikawa, H., Shimizu, K. 2015. Multiple biological effects of olive oil by-products such as leaves, stems, flowers, olive milled waste pulp, and seeds of the olive plant on skin. *Phytotherapy Research*. 29: 877–886.
- Lafka, T., Lazou, A., Sinanoglou, V., Lazos, E. 2013. Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods*. 2: 18–31.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P.L., Chang, Y.T.,

- Huang, P.L. 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307: 1029–1037.
- Lopez-Escudero, 2010. Verticillium wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relations with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathologia Mediterranea*. 49: 370-380.
- López-Escudero, F., Roca, L., Mercado, J., Valverde-Corredor, A., Blanco-López, M. 2008. Factores implicados en la importancia y distribución actuales de la verticilosis del olivo en Andalucía, XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. España. p.108
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J. 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344:1-50.
- Maggio, R., Kaufman, T., Carlo, M., Cerretani, L., Bendini, A., Cichelli, A., Compagnone, D. 2009. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*. 114: 1549-1554.
- Magrama, 2014a. Aceite de oliva. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceite.aspx>.
- Magrama, 2014b. Aceituna de mesa. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceituna.aspx>
- Marcilla-Goldaracena, I., Porrás-Soriano, A., Duque-Lain, R., Porrás-Soriano, R., Porrás-Piedras A., Leon-Egido, M. 2006. Reducción de la Verticilosis de los olivos mediante injerto. *Vida rural*. 238: 48-58.
- Martin, F., Blair, J., Coffey, M., 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*. 66: 19-32.
- McMahon P. 2012. Effect of nutrition and soil function on pathogens of tropical tree crops. *Plant Pathology*. 10: 241-272.
- Montes, F., Páez, J., Vega, J., Duhart, M. 1997. Épocas de aislamiento de *Verticillium dahliae* Kleb en olivar en la provincia de Sevilla. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*. 23:439-447.
- Morales-Lizcano, N., Dobinson, K. 2013. *Verticillium dahliae* hydrophobins: a multifunctional family. 11<sup>th</sup> International Verticillium Symposium Germany.
- Navarro-Cerrillo, R., Gallo-Ibáñez, L., Sánchez-Hernández, E., Fernández-Rebollo, P., Trapero-Casas, A. 2004. Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Investigación Agraria. Sistemas y recursos forestales* 13: 550-558.
- Nomikos, N., Nomikos, G., Kores, D. 2010. The use of deep friction massage with olive oil as a means of prevention and treatment of sports injuries in ancient times. *Archives of Medical Science*. 6: 642-645.
- Parkunan, V., Johnson, C., Bowman, B., Hong, C. 2010. First report of *Phytophthora*

- inundata* associated with a latent infection of tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Virginia. New Disease Reports. 20: 40.
- Pegg, G.F., Brady, B.L. 2002. Verticillium wilts. CAB International, Wallingford. British library. London UK.
- Pinillos, V., Cuevas, J. 2009. Open-pollination provides sufficient levels of cross-pollen in Spanish monovarietal olive orchards. HortScience 44:499-502.
- Resende, M., Flood, J., Cooper, R. 1994. Host specialization of *Verticillium dahliae*, with emphasis on isolates from cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathology 43: 104-111.
- Rodrigues, F., Pimentel, F.B. Oliveira, M.P. 2015. Olive by – products: Challenge application in cosmetic industry. Industrial Crops and Products. 70: 116-124.
- Rodríguez-Jurado, D., Morano-Moreno, R., and Bejarano-Alcázar, J. 2008. Dispersion of defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in host crops by irrigation water in southern Spain. Journal of Plant Pathology 90 (S2): 419-420.
- Safaiefarahani, B., Mostowfizadeh-Ghahamfa, R., Cook, D. 2013. Characterisation of *Phytophthora inundata* according to host range, morphological variation and multigene molecular phylogeny. Phytopathologia Mediterranea. 52: 46-65.
- Sánchez, M.E., Muñoz, M., Guerrero, N., Cuesta, J., Expósito, D., Raya, M.C., Trapero, A. 2008. La podredumbre radical del olivo y acebuche. Hoja divulgativa, Consejería del medio ambiente, Junta de Andalucía. 1-6 pp.
- Sánchez-Hernández, M.E., Muñoz-García, M., Brasier, C.M., Trapero-Casas, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. Plant Disease. 85: 411–416.
- Sánchez-Hernández, E., Ruiz-Dávila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M.A., Trapero-Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of Young olive trees in southern Spain. European Journal of Plant Pathology 104: 347–357.
- Sánchez-Hernández, M.E., Ruiz-Dávila, A., Trapero-Casas, A. 1997. First report of *Phytophthora megasperma* and *Pythium irregulare* as olive tree root pathogens. Plant Disease 81: 1216.
- Semalty, M., Semalty, A., Joshi, G.P., Rawat, MS. 2010. Development and in vivo studies of herbal hair oil for hair growth promotion. Indian Drugs. 47: 28-32.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A., Vilas, L. 2006. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. Food Science Technology International. 12: 385–396.
- Soler R., Espín, J., Wichers, H. 2000. Review oleurope in and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1013–1023.
- Trapero, C., Roca, LF., Alcántara, E., López-Escudero, FJ. 2011. Colonization of olive inflorescences by *Verticillium dahliae* and its significance for pathogen spread. Journal Phytopathology 159: 638-640.
- Verallo-Rowel, VM., Dillague, KM., Syah-Tjundawan, BS. 2008. Novel antibacterial and emollient effects o cocnut and virgin olive oils in adult atopic



dermatitis. Dermatitis. 19:  
308-315.

## 2. PROBLEMÁTICA DE LOS TEFRÍTIDOS EN EL MUNDO

### 2.1. Generalidades

Las “moscas de la fruta” se encuentran ubicadas taxonómicamente en el orden Diptera, suborden Brachycera, sección Cyclorrhapha, superfamilia Tephritoidea, familia Tephritidae, que constituye el grupo más diversificado con 471 géneros, con aproximadamente 4257 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales. Las “moscas de la fruta” causan daños físicos directos a la fruta y daños secundarios causados por la entrada de microorganismos patógenos, además de las implicaciones como las medidas de cuarentena y los tratamientos de post-cosecha se estima que las pérdidas anuales en productividad en los países fruticultores pueden estar entre el

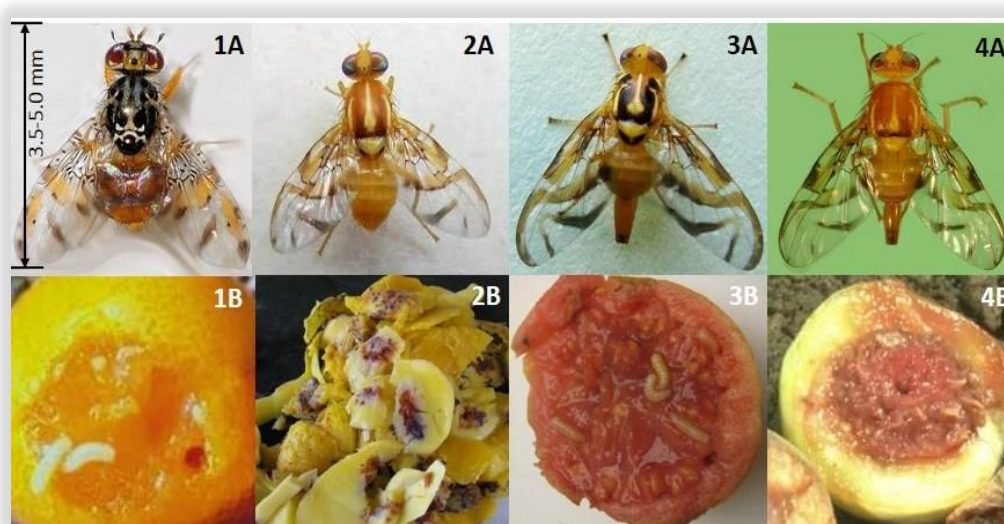
30 y 50%, lo que representa alrededor de US\$100 millones de dólares (Fig. 5) (FAO, 2011, Badii et al., 2015).

Los análisis de riesgo de plagas para la exportación de frutas y algunas hortalizas catalogan a las diferentes especies de moscas de la fruta como fitófagos de cuarentena para los países importadores o con alto riesgo de introducción teniendo en cuenta su característica que le permite transportarse en el producto a exportar, lo cual tiene altos impactos negativos para los países exportadores de fruta (Oroño et al., 2006).

El manejo de las moscas de la fruta se hace en general mediante tratamientos adulticidas con insecticidas de contacto de amplio espectro, en dosis altas para tratar

de aumentar la efectividad, con los consecuentes problemas ambientales y de salud, además de

la generación de resistencia (Magaña et al., 2007, Vontas et al., 2011).



**Figura 5.** Adultos de “moscas de las fruta” y sus daños. (1A), *Ceratitis capitata* Wiedemann (1B), daños en cítricos. (2A), *Anastrepha obliqua* Macquart. (2B), daños en pulpa de mangos. (3A), *Anastrepha striata* Schiner. (3B), daños en guayaba. (4A), *Anastrepha fraterculus* Wiedemann. (4B), daño en melocotón.

## 2.2. Especies de mayor incidencia en fruticultura

Aunque resulta complejo establecer el orden de importancia mundial de los tefrítidos por sus daños, bien es cierto que los que indicamos a continuación son plagas clave en fruticultura Mediterránea, tropical y subtropical, con énfasis en la “mosca del olivo”,

del máximo interés para la presente tesis doctoral.

### 2.2.1. *Bactrocera oleae* “mosca del olivo”

La mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin), es uno de los insectos que más daños causan a la producción de olivo en el mundo, su principal hábitat se encuentra en la zona Mediterránea, sur de Europa, en las costas del norte y sur de

África, en el Centro-Sur de Asia (Rice, 2000, Tzanakakis, 2006), recientemente en las costas de California (USA) y en el Noroeste de México (Daane et al., 2015).

La mosca del olivo, que es polivoltina, inverna en estado de pupa enterrada en el suelo a escasa profundidad. Los adultos hacen su aparición al inicio de la primavera, manifiestan actividad diurna en ausencia de viento y a temperatura de 14-15°C, se alimentan con avidez de fluidos azucarados: melazas de homópteros, en particular de cochinillas, néctar de flores, zumo de frutos maduros, así prolongan su longevidad hasta comenzado el período estival, o incluso bien entrado el mismo, en función del número de días con temperatura media superior a 30°C, cuando finalmente las aceitunas comienzan a estar apropiadas para la oviposición lo que estimula la maduración de ovarios y la consiguiente salida de la diapausa

reproductora de las hembras (Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007, Quesada-Moraga et al., 2009). Transcurridos 4-6 días del acoplamiento, completada la maduración de los ovarios, la hembra da comienzo a la oviposición, para ello elige las aceitunas más gruesas, pero todavía verdes, guiadas por estímulos visuales y químicos (Fig. 6). El período de oviposición abarca aproximadamente 1 mes en verano a poco más de 3 meses en invierno, pero las hembras que comienzan a ovipositar antes del invierno pueden conservar tal actividad por espacio de 5-6 meses. Una hembra puede poner varios cientos de huevos, el máximo alcanzado llega a 1200, la producción media diaria varía de 20 a 70 huevos con máximo a temperaturas comprendidas entre 20°C y 27°C, en presencia de elevada HR y drupas con nuez lignificada condiciones del final del verano en el área mediterránea

(Tzanakakis, 2006; Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007).



**Figura 6.** La mosca del olivo. Adulto de *B. oleae* ovipositando en una aceituna (1). Larva de *B.oleae* dentro de los tejidos de una aceituna (2). Daño por oviposición en aceituna (3). (Daane et al. 2011a).

La incubación dura de no menos de 2 días (a 28-30°C) hasta casi 3 semanas (máx. observados 19 días) en invierno. El estado de larva pasa por tres estadios, transcurre en el mesocarpio, para su completo desarrollo requiere 10 a 12 días en agosto-octubre y hasta 150 días en invierno. Influyen la variedad, el estado de maduración del fruto y por consiguiente la mayor o menor disponibilidad de sustancias útiles al crecimiento, al punto que se pueden alcanzar desarrollos breves aún en febrero-marzo en frutos que

están en el justo punto de maduración (Tzanakakis, 2006, Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007).

El nivel mínimo de aceite necesario para el desarrollo larvario está en torno al 7%. Esencial también el contenido de ácido oleico, ácido linoléico, sitosteroles y tocoferol, así como proteínas y aminoácidos (Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007). La pupación se realiza en la drupa o puede abandonarla para caer al suelo, en éste la larva de 3ª edad se

mueve activamente para buscar el punto apropiado y en aproximadamente 7 horas construye el pupario. Bajo la copa de los árboles, la mayor abundancia de puparios se encuentran entre la hojarasca y los primeros centímetros del suelo, se estima que el 80.0% de larvas pupan en los 3 primeros cm del suelo. La duración del estado pupal oscila entre los 10 días a varios meses (hasta 4) según la estación del año (Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007).

El número de generaciones anuales es variable (Tzanakakis, 2006; Santiago-Álvarez y Quesada-Moraga, 2007), en España, se han establecido tres zonas de ataque en atención a la gravedad de sus daños (Alfaro, 2005):

- Una costera, en la que el insecto es endémico, que se extiende por el litoral desde la provincia de Barcelona hasta la de Huelva, sobresaliendo las comarcas de

Tortosa (Tarragona), Maestrazgo (Castellón), Liria (Valencia) y algunas otras en las provincias de Málaga y Huelva, en las que el porcentaje de fruto picado no suele ser inferior al 80.0% y llega muchos años al 100.0%. Son áreas con humedad relativa elevada y sin mínimos exagerados para ésta ni para la temperatura.

- Una segunda zona, con ataques inconstantes o accidentales, como ocurre en el bajo Aragón y en parte de los olivares de las provincias de Sevilla y Badajoz, así como también en los parajes de elevada altitud de las provincias costeras de la primera zona.

- En la tercera zona, que comprende los olivares situados en la región central, de clima ya más frío y situación alejada de los focos endémicos, los daños de la

mosca suelen tener menor importancia.

Los daños causados por éste insecto pueden ser directos por la disminución del peso y rendimiento y depreciación de la cosecha e indirectos por deterioro de las características organolépticas del aceite, por el aumento de la acidez debida a los hongos y bacterias que se desarrollan en el interior de las galerías hechas por el insecto dentro de la aceituna. En cuanto al proceso alimenticio de las larvas sobre la pulpa del fruto, se estima que va desde 50 a 150 mg por larva, dependiendo de la variedad (Neuenschwander y Michelakis, 1978). Pero más importante, la disminución en la calidad del aceite depende del porcentaje de frutos dañados, la etapa de desarrollo del fruto y la variedad (Gucci et al. 2012). De hecho, se ha detectado en algunas variedades un incremento de acidez directamente proporcional al ataque del tefritido, con valores de

0,6, 1,5 y 3,4 para niveles de ataque de aceituna del 10, 15 y 100% (Mraicha et al., 2010).

Se estima que este insecto causa pérdidas entre 15 y 40% de la producción mundial del olivar con valores cercanos a los 800 millones de euros y con aumentos en los costes para su control de 100 millones de euros (Mazomenos et al., 2002, Haniotakis, 2005, Quesada et al., 2009). Incluso, se tiene constancia de pérdidas del 100% de algunas variedades de mesa y hasta el 80% del valor del aceite causadas por *B. oleae* (Daane y Johnson, 2010).

El excesivo empleo de los insecticidas químicos para el control de la mosca del olivo durante más de 50 años ha causado importantes efectos sobre los principales ecosistemas y la salud humana (Haniotakis 2005). Por otro lado, el empleo reiterado de un número muy limitado de materias activas ha hecho que la mosca desarrolle

resistencia a las mismas, lo que se ha traducido en una pérdida de eficacia de algunos insecticidas como organofosforados, carbamatos, piretroides y más recientemente el spinosad (Margaritopoulos et al., 2008, Kakani et al. 2008; 2010)

### **2.2.2. *Ceratitis capitata* “mosca mediterránea de la fruta”**

La mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), es otro insecto considerado como uno de los más destructivos de la producción frutícola en varios países, ataca a más de 300 especies de frutas, tiene alta capacidad reproductiva y adaptabilidad a condiciones ecológicas diversas (Klassen et al., 1994). *C. capitata* es originaria del sur de África y actualmente tiene una amplia distribución en los países de la costa mediterránea, oeste de Australia, África occidental, Asia, América Central (Costa Rica,

El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá), Sur de América y el Caribe. Está sujeta a estrictas medidas de cuarentena y a extensivos programas de control, lo cual limita las exportaciones de fruta (Papadopoulos et al., 2001; 2002, Imoulan et al., 2011).

Las hembras pueden llegar a ovipositar hasta 800 huevos con una tasa de puesta diaria de 11 huevos, las larvas eclosionan dentro del fruto y se alimentan de la pulpa fresca, luego salen del fruto y pupan generalmente en el suelo. El ciclo biológico depende de la temperatura; la actividad se reduce durante el invierno, los huevos eclosionan de 2 a 4 días luego de la puesta en climas cálidos y entre 16 a 18 días en climas fríos, las larvas se alimentan durante 6 a 11 días en temperaturas de 28 a 13°C, la pupación se realiza generalmente debajo de la planta huésped y los adultos emergen después de 6 a 11 días, alcanzan la madurez a los 4 o



5 días después de emergencia y pueden vivir hasta 2 meses (Mitchell y Saul, 1990, Liquido et al., 1995).

### **2.2.3. *Anastrepha* spp**

Las especies nativas suramericanas del género *Anastrepha*, son también limitantes de la producción frutícola del mundo, siendo de mayor importancia económica *A. fraterculus*, que se distribuyen desde el sur de Texas (EUA), a través de México Centro y Sudamérica (Hernández- Ortiz y Aluja, 1993).

Es una especie polífaga, a la cual se asocian alrededor de 80 especies de plantas hospedantes de 20 familias de plantas, en México se reportan 11 especies diferentes de plantas mientras que en Brasil se han registrado 67 especies vegetales principalmente de las familias, Myrtaceae, Rosaceae y Rutaceae, y en Venezuela se habla de alrededor de 14 especies pertenecientes a 6

familias diferentes (Aluja et al., 2003, Hernández-Ortiz y Morales-Ortiz, 2003, 2004, Zucchi, 2007).

*A. obliqua* (Macquart), la mosca antillana de la fruta, es la principal plaga del cultivo de mango (*Mangifera indica* L. Bark) y guayaba (*Psidium guajava* L.), aunque también infesta a especies de la familias Anacardiaceae, Annonaceae, Bignoniaceae, Fabaceae, Myrtaceae y Rosaceae (Oroño et al., 2006); presenta una distribución muy amplia, con registros desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina, con distribución en todo el Caribe, Jamaica, Trinidad, México a Panamá, Venezuela, Ecuador y en Brasil. *Anastrepha obliqua* fue descubierta en Florida en 1930.

### **2.3. La lucha biológica contra las principales moscas de la fruta en el mundo**

En Europa, el control de las moscas de la fruta reside en el

empleo de insecticidas químicos de síntesis, de acuerdo con dos estrategias, el tratamiento convencional por pulverización generalizada de todo el árbol y la aplicación del insecticida junto con un cebo en la parte más soleada del mismo (Quesada-Moraga et al., 2009). Además, la irrupción de la directiva europea 2009/128/CE de uso sostenible de insecticidas, y su transposición para el Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios a través del Real Decreto 1311/2012 (RD) y el Plan de Acción Nacional (PAN), y la puesta en práctica de éstos en el año 2014, promueven el empleo preferente de medios no químicos como estrategia fundamental de control de plagas, además de limitar los tratamientos aéreos. Por todo ello, la búsqueda de métodos de control eficaces, económicamente viables y compatibles con la legislación agraria vigente se ha convertido en un aspecto fundamental de la sanidad vegetal.

En el caso de las moscas de la fruta, se recomiendan estrategias culturales para reducir poblaciones entre las cuales están la recogida temprana de fruta atacada, el trampeo masivo con diferentes tipos de mosqueros cebados con atrayentes alimenticios o con feromonas, de limitado efecto cuando las poblaciones de la mosca se encuentran en plena curva de crecimiento, así como el control biológico por medio de entomófagos y entomopatógenos.

La clara dependencia que tiene el control de tefrítidos del empleo de insecticidas químicos de síntesis, junto con los nada desdeñables costes sociales a la salud pública y al medio que originan estos productos de síntesis, mantienen abierta la problemática medioambiental asociada al control de plagas en la fruticultura y promueven la implantación de nuevos métodos de Control de Plagas de Insectos, inocuos a tales

efectos, al amparo de los principios que rigen la sostenibilidad en la actividad agrícola.

En suma se abogaba por el desarrollo de medidas alternativas para la protección de los cultivos frente al ataque de los insectos que además de ser aceptadas ecológicamente muestren la suficiente eficacia. En lo que respecta al olivar entre estas medidas encontramos los insecticidas específicos y los agentes de control biológico tanto macrobiano, parasitoides y depredadores, como microbiano, virus, bacterias, protozoos y hongos entomopatógenos. En la actualidad, se pretende dar protagonismo al spinosad, un insecticida producido por un actinomiceto en fermentación, para los tratamientos cebo frente a la mosca del olivo, con resultados dispares hasta la fecha. Se dispone además de las materias activas de origen natural que permite, junto al spinosad, el

Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91, tales como piretrinas naturales, de conocida fotolabilidad y con resultados no siempre contrastados, sin obviar su efecto en la fauna útil.

### **2.3.1. Uso de parasitoides para el control de moscas de las frutas**

El naturalista alemán O.M Reuter en 1913, definió a los parasitoides como un insecto que durante su fase larvaria vive dentro o sobre el cuerpo de su hospedador, para finalmente causarle la muerte, originando un adulto de vida libre, separándolo del concepto de parásito, ya que el parasitoide destruye a su hospedador antes de alcanzar el estado adulto, mientras que el parásito consigue su propia comida de otro organismo,

causándole un daño o lesión menor, sin que por ello llegue a matarlo al menos de una manera directa. El parasitoide se alimenta de la hemolinfa de su hospedador, que sigue vivo pero sin síntomas evidentes. A medida que el parasitoide crece ataca progresivamente los órganos vitales de su huésped. Generalmente el parasitoide requiere de un único hospedador mientras que el parasito se alimenta de varias presas hasta llegar a su estado adulto (Pina, 2008).

La hembra adulta de vida libre es la encargada de localizar y seleccionar el hábitat y los hospedantes para realizar la puesta. La puesta del huevo o larva puede realizarla directamente dentro o sobre el huésped (Pina, 2008). La mayoría de los parasitoides se han clasificado de acuerdo a sus hábitos alimenticios en dos grandes grupos: ectoparasitoides, son aquellos que se desarrollan sobre la plaga,

alimentándose externamente, con la piezas bucales insertadas en el cuerpo del hospedador mientras que los endoparasitoides se desarrollan dentro del hospedor alimentándose desde el interior, sin embargo algunas especies empiezan siendo ectoparasitoides y luego finalizan su desarrollo internamente como endoparasitoides o viceversa (Pina, 2008). Cuando un solo individuo emerge de su hospedador se les llama solitarios, mientras que aquellos que se desarrollan varios parasitoides en un hospedante se les llaman gregarios. Normalmente estos insectos son parasitoides en sus estados inmaduros, y en su forma adulta son de vida libre (Montoya et al. 2012).

Generalmente los parasitoides utilizan las antenas y el ovipositor para evaluar si el huésped es apto para la puesta, para ello recurren a una gran variedad de estímulos. Los parasitoides son un recurso importante en el control de insectos,

sin embargo tienen características morfológicas y de comportamiento que hacen que esta estrategia sea muy exigentes en su uso, ya que depende de una serie de requisitos como procedimientos eficientes de cría en masa, desarrollo de metodologías para el embalaje que protejan la sobrevivencia e integralidad del insecto y métodos para liberación que permitan una distribución uniforme del parasitoide en los sitios de control (Montoya et al. 2012).

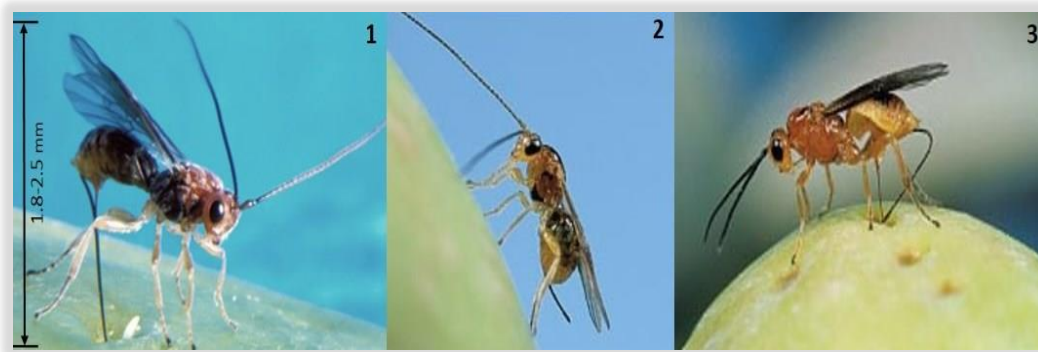
Se han hecho esfuerzos de establecer algunas especies de parasitoides para el manejo de tefrítidos como *Diachasminorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), introducido en América Latina y el sur de Estados Unidos para el control de especies de *Anastrepha* spp y *Ceratitis capitata* (Suarez, et al. 2014). Igualmente *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) fue

liberado en Guatemala en plantaciones de café para el control de *C. capitata* con resultados poco exitosos (Sivinski et al., 2000). Los parasitoides braconídeos *Utetes anastrephae* (Viereck) y *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) han sido estudiados para el control de *A. obliqua* como parte de programas de manejo integrado de plagas en Argentina (Serra et al., 2011). *Fopius arisanus* Sonan (Hymenoptera: Braconidae), ha sido evaluado sobre huevos *C. capitata* y *Anastrepha* spp., obteniéndose parasitismos que van desde el 10% al 21% (Bautista, et al., 1999, Zenil et al., 2004).

Dentro de las medidas de control biológico para de la mosca del olivo en España, se han adelantado trabajos con el parasitoide *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae), un endoparásito que parasita larvas del tercer estadio. Se le han dedicado muchos esfuerzos,

sin embargo se ha mostrado poco viable con parasitismos entre 22.4% y 23.4%, igualmente en California se ha evaluado el parasitismo de *Bracon celer* Szépligeti, *Psytalia huminlis* (Silvestri), *Psytalia lounsburyi*, *Psytalia ponerophaga* (Silvestri) y *Uretes africanus* (Silvestri) (Fig.7), sobre *B. oleae*

obteniéndose bajos niveles de parasitismos. En general los resultados de control de tefrítidos con parasitoides han sido moderados (Sime et al., 2007, Miranda, et al., 2008, Daane et al., 2015).



**Figura 7.** Parasitoides de moscas de las frutas. (1), *Fopius arisanus*. (2), *Psytalia lounsburyi*. (3), *Bracon celer*. (Daane et al., 2011b).

### 2.3.2. Uso de microorganismos entomopatógenos para el control de las moscas de la fruta

Existen pocas referencias sobre enfermedades causadas por bacterias, virus y protozoos en tefrítidos. Los virus entomopatógenos son entidades patogénicas intracelulares, su

principal componente es un ácido nucleico que puede ser ADN o ARN ambos de cadena doble o sencilla. Su genoma tiene la capacidad de replicarse y adaptarse a los cambios ambientales pero son funcionalmente activos solo dentro de las células de sus huéspedes (Caballero y Williams, 2008). En

algunos virus la nucleocapsida (ácido nucleico + capsida proteica) puede estar envuelta por una bicapa lipídica en cuyo caso se le llama virión, a su vez los viriones pueden estar o no, incluidos en una matriz proteica que se denomina cuerpo de inclusión (OB, del inglés occlusion body). La formación de OB es una característica común de las familias Baculoviridae, Poxviridae y Reoviridae, en las cuales esta estructura ha evolucionado como un mecanismo de protección contra la degradación ambiental lo que les confiere una gran ventaja como bioplaguicidas (Caballero y Williams, 2008). En la familia Poxviridae, los virus específicos de insectos se encuentran clasificados en la subfamilia Entomopoxviridae que se caracterizan por formar OBs denominados esferoides. Dentro de la familia Rhabdoviridae se encuentran algunos virus que son transmitidos a través de artrópodos especialmente insectos.

Los Rhabdovirus son miembros de la familia Rhabdoviridae, su genoma esta constituido por ARN de cadena sencilla. Algunos entomopoxvirus (DIEPV) y rhabdovirus (DIRhV), han sido reportados en parasitoides de tefrítidos, los cuales son inoculados al hospedante en el momento de la parasitación (Khoo y Lawrence, 2002, Laurence y Matos, 2005). Los virus entomopatógenos son específicos y son parásitos obligados, lo que genera dificultades para su aplicación. En *C. capitata* y *B. tryoni* (Froggatt), se han descrito virus del grupo picornavirus y en *B. oleae* se han encontrado virus pertenecientes al grupo de los reovirus (DpRV) (Plus, 1989).

En cuanto a las bacterias, algunas investigaciones ponen de manifiesto distintos grados de eficacia de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) frente a larvas y adultos de *C. capitata* y *B. oleae* (Alberola et al., 1999, Vidal-

Quist et al., 2009, Faiza et al., 2013, Elleuch et al., 2014). Sin embargo por el carácter endófito de las larvas y el tipo de alimentación de los adultos de las moscas de las frutas, hacen este recurso poco viable para su control, de la misma manera hay limitaciones en el registro de formulaciones de *B. thuringiensis* que contengan la beta-exotoxina ya que este compuesto es tóxico para mamíferos y es altamente persistente en el ambiente (Berlitz et al., 2006).

Los protozoarios entomopatógenos regulan poblaciones de algunos insectos, sin embargo se les ha prestado poca atención como agentes de control microbiano debido a que requieren mucho tiempo para matar al huésped y por consiguiente no ocasionan un efecto inmediato. Los protozoarios son organismos unicelulares, existen aproximadamente 1200 especies

que causan enfermedades en los insectos. Las relativas dificultades en el estudio, la identificación y la producción de protozoos en grandes cantidades explican el hecho que ha habido poca atención de utilizarlos en este campo. Su aplicación está limitada también porque generalmente causan un efecto crónico en lugar de infecciones agudas. La transmisión se realiza por vía oral junto al alimento que toma el insecto plaga o por infección transovárica, también se transmiten mediante parasitoides que actúan como vectores. Algunos microsporidios, cuya posición taxonómica está en la actualidad más próxima a los hongos, como *Nosema tephritidae* (Fujii and Tamashiro), han mostrado cierta eficacia frente a adultos de *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) y *C. capitata* (Badii et al., 2015).

Ahora bien, otro recurso evaluado sobre larvas de moscas de



las frutas, han sido los nematodos entomopatógenos, aunque no son microorganismos tienen potencial para el control de plagas del suelo. Los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son agentes de control biológico que matan a los insectos a través de una simbiosis mutualista con bacterias; *Xenorhabdus* spp. y *Photorhabdus* spp. Los juveniles infectivos (IJ), la única etapa de vida libre del nematodo, entran al hospedero a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) o, en algunos casos, a través de la cutícula. Después de entrar al hemocele del huésped, los nematodos liberan sus simbiosis bacterianos, que son los principales responsables de la muerte del huésped en menos de 48 horas. Investigaciones con *Steinernema feltiae* (Filipjev), en laboratorio sobre larvas de la mosca de la cerezas mostraron mortalidades cercanas al 95% (Kepenekci et al., 2015).

Igualmente las evaluaciones con los nematodos *Steinernema carpocapsae* (Weiser) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) contra larvas de *C. capitata*, han mostrado un buen control en laboratorio (Gazit et al., 2000), sin embargo, en tefrítidos su aplicabilidad a nivel de campo ha sido baja, ya que aunque las larvas de tercer instar generalmente abandonan el fruto y pupan en el suelo donde pueden ser atacadas por los nematodos, la conformación y estructura del pupario lo hace poco accesible a los nematodos.

Los hongos entomopatógenos han recibido especial atención en los últimos 20 años por sus sobresalientes propiedades para el control de tefrítidos, su modo de acción por contacto, por vía tegumentaria, ventajas derivadas de la posibilidad y facilidad relativa de su producción en masa, así como su capacidad de producir compuestos con capacidad insecticida por

ingestión, y su compatibilidad con el medioambiente y los artrópodos no diana, les sitúan en primera línea mundial para el desarrollo de estrategias alternativas de control de la mosca del olivo (Ekesi et al., 2003, Quesada-Moraga et al., 2006; 2008a; 2009; Garrido-Jurado et al. 2011a, Yousef et al. 2013).

#### **2.3.2.1.- Los hongos entomopatógenos y sus compuestos activos para el control de las moscas de las frutas**

Se estima que existen aproximadamente 1,5 millones de especies en el Reino Mycota, de las cuales tan sólo 110.000 han sido descritas, y dentro de éstas, 700 especies de 90 géneros son patógenas de insectos (Mueller y schmit, 2007; Kirk et al., 2008).

Los hongos Entomopatógenos (HE), son enemigos naturales de los artrópodos por lo que tienen un papel fundamental en la regulación de las poblaciones (Goettel et al.,

2005). Estos hongos presentes de forma natural en el suelo, en el filoplano de las plantas e incluso en el aire (Meyling y Eilenberg, 2006; Quesada-Moraga et al., 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008), están unidos de manera intrínseca a sus hospedantes, en un proceso de continua co-evolución que hace que estén adaptados a vivir a expensas de estos de los que se obtienen la energía necesaria para el desarrollo (Roy et al., 2010). De esta forma, en función de la asociación trófica de los HE con sus hospedantes, se pueden distinguir tres grupos, biotrofos que se alimentan únicamente de células vivas y tal proceso cesa con la muerte de las mismas, necrotrofos que matan al hospedante y después crecen a expensas de los tejidos muertos y hemibiotrofos que son inicialmente biotrofos y una vez que el hospedante muere se vuelven necrotrofos (Quesada-Moraga y

Santiago-Álvarez, 2008; Vega et al., 2009). La limitación que opone el carácter biotrofo de los Entomophthorales a su desarrollo para el control biológico inundativo, ha situado en primera línea a los ascomicetos mitospóricos que han suscitado un creciente interés para su desarrollo como agentes de control biológico (Shah y Pell, 2003, Goettel et al. 2005, Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Así en la actualidad existen numerosas preparaciones comerciales de HE que están basadas en un número restringido de especies como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch., *Isaria fumosorosea* (Wize) y *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & W. Gams, entre otros (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Roy et al., 2010).

### **2.3.2.1.1.- Posición sistemática**

El sistema de clasificación que se adopta aquí está de acuerdo con el propuesto por Hibbett et al. (2007), para el reino de los hongos (Mycota), en el que la Clase Oomycetes del filo Oomycota, que incluye especies entomopatógenos, queda excluida. Por tanto la presencia de HE queda restringida a los filos Entomophthoromycota (Humber, 2012, Gryganskyi et al., 2012) y Ascomycota, donde se sitúan respectivamente los órdenes Entomophthorales e Hypocreales a los que pertenecen las especies más importantes de HE (Fig. 8). La mayoría de las especies de la familia Entomophthoraceae (Entomophthora, Zoophthora y Batkoa) situada en el filum Entomophthoromycota, son patógenos de insectos y dependen de éstos para completar su ciclo de vida, causan regularmente infecciones masivas haciéndolos

importante candidatos en el hongos biocontrol (Gryganskyi et al., 2012).

Aunque las especies del orden Entomophthorales pueden causar importantes epizootias, el uso de estos hongos, que son biotrofos obligados, como agentes de biocontrol no está muy extendido pues por lo general presentan una gama muy estrecha de hospedantes y sólo unas pocas especies son fáciles de cultivar en laboratorio (Pell et al., 2001). Por otro lado, las especies de HE más distribuidas y de mayor relevancia pertenecen a los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME), clasificados en el orden Hypocreales del Filo Ascomycota.

La inmensa diversidad biológica aporta información tan variable que determinarla ha sido un proceso evolutivo complejo. Estudios de ecología, biología, taxonomía, conservación, genética, bioquímica y sus diferentes ramificaciones, no han logrado

interpretar tal abundancia de información, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas de caracterización molecular, que han empezado a aportar herramientas tan útiles como los marcadores moleculares, los cuales funcionan como identificadores genotípicos, la diversidad genética o la estimación de relaciones genéticas entre otras.

En 2002, se inició “Assembling the Fungal Tree of Life” (AFTOL; <http://aftol.org/>), cuyo principal objetivo es mejorar significativamente la comprensión de la evolución de los hongos, que podría ampliar nuestro conocimiento sobre la evolución de los ecosistemas, así como facilitar la creación de herramientas de diagnóstico que promuevan el descubrimiento de muchas otras especies de hongos aun por conocer. El desarrollo de las bases de datos está basado en la biología molecular y no molecular con representación de todos los linajes con mayor

repercusión en el Reino Mycota (Fig. 8). Estas bases de datos utilizan una gran cantidad de marcadores moleculares, entre los que se encuentra el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF1-  $\alpha$ ), que forman una estructura filogenética y categorías taxonómicas de gran interés para la comunidad científica (Rehner, 2009).

#### **2.3.2.1.2. Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos**

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las especies de HE más distribuidas y de mayor relevancia pertenecen a los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME), clasificados en el orden Hypocreales del Filo Ascomycota. Estos hongos se caracterizan por formar micelio del que se originan las esporas asexuales o conidios a partir de células conidiógenas especializadas formadas en hifas simples o ramificadas denominadas

conidióforos. Los AME reúnen a la mayoría de especies utilizadas en el control microbiano y presentan un amplio rango de hospedantes que incluye a casi todos los taxones de insectos de interés agrícola.

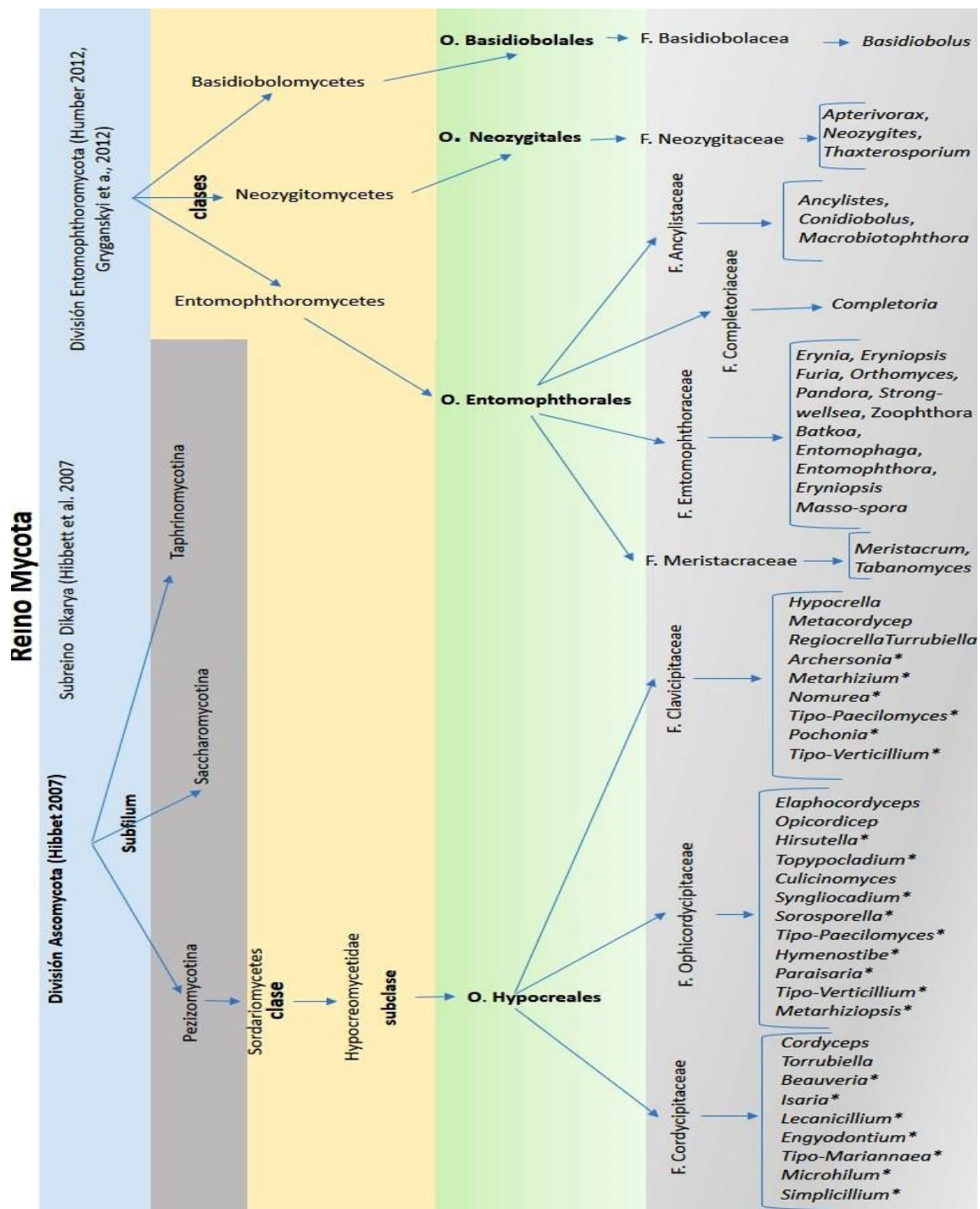
#### **2.3.2.1.3. Modo de acción**

La mayoría de los AME tienen ciclos vitales que sincronizan con los de sus hospedantes, así como con las condiciones ambientales del entorno (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Estos hongos son únicos en su modo de acción, ya que actúan por contacto, es decir, pueden infectar al hospedante a través del tegumento. Así, de un modo general, los AME presentan varias fases en el desarrollo de una micosis que comienza por la adhesión del propágulo infectivo a la cutícula del hospedante. Si las condiciones de humedad, temperatura y requerimientos nutricionales son

óptimos en el tegumento, el propágulo infectivo germina y emite un tubo germinativo para atravesar la pared corporal mediante mecanismos bioquímicos y mecánicos que facilitan la infección propiamente dicha, y así poder invadir el hemocele (Fig. 9) (Hajek y St Leger, 1994; Quesada-Moraga y Santiago- Álvarez, 2008).

La capa más externa de la cutícula de los insectos, la epicutícula es impermeable y actúa

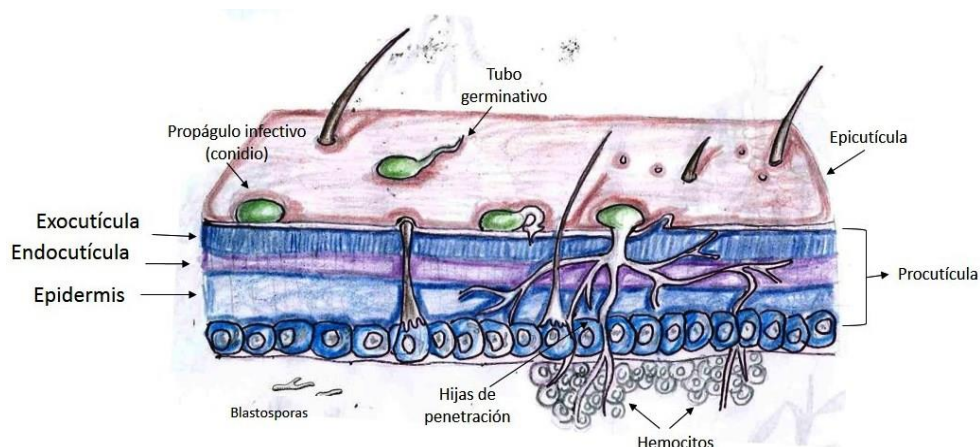
como primera barrera contra el ataque microbiano, está formada por una mezcla heterogénea de lípidos, alquenos de cadena larga, ésteres y ácidos grasos, las lipasas producidas por el microorganismo hidrolizan los ésteres de las lipoproteínas, grasas y ceras del insecto. Una vez que la epicutícula se rompe, el hongo produce grandes cantidades de proteasa (Pr1) que degradan el material proteínico que se encuentra en la procutícula (Ali, et al., 2014).



**Figura 8.** Clasificación sistemática de los Hongos Entomopatógenos. Los géneros entomopatógenos *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) y las ARS collection of the entomopathogenic fungal cultures (<http://arsef.fpsnl.cornell.edu>). Los géneros marcados con asterisco son anamorfos y el resto telomorfos. Para las distintas divisiones: O=Orden; F=Familia.

De hecho, las enzimas que descomponen la cutícula de los insectos son consideradas un factor importante de virulencia de los hongos entomopatógenos y actualmente son candidatas potenciales para el biocontrol de insectos. Una vez dentro, el hongo crece en la cavidad general

del hospedante donde, tras vencer las respuestas defensivas celular y humoral, comienza a multiplicarse por medio de cuerpos hifales e hifas, que provocan la muerte mediante varios procesos y acciones como el agotamiento de nutrientes, la obstrucción física e invasión de órganos y toxicosis



**Figura 9.** Modo de acción de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno.

La muerte del hospedante marca el final de la fase parasítica para pasar a la saprofítica, que acarrea el crecimiento necrotrofo del hongo. En condiciones favorables, se desarrollarán hifas que emergerán del cadáver, con la consiguiente producción de esporas y la

liberación de los conidios que iniciarán un nuevo ciclo de infección (Fig. 10) (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Estos agentes pueden ser aplicados de forma inundativa, con medios convencionales, dado que se multiplican con facilidad y son



susceptibles de posterior manejo para la elaboración de formulados insecticidas, donde la eficacia de un producto de estas características reside en la correcta selección de la cepa que formará el ingrediente activo.

Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) son un componente importante del microbiota del suelo y muy importante en suelos del olivar (Quesada-Moraga et al., 2007), aunque su presencia también es notable en el filoplano del olivo (Quesada-Moraga, Santiago-Álvarez,

2008). En este sentido se ha observado en la Península Ibérica y los archipiélagos Balear y Canario que *B. bassiana* y *M. anisopliae* son especies características en suelo de ecosistemas tanto cultivados como naturales (Quesada-Moraga, Santiago-Álvarez, 2008). De hecho la especie fúngica más frecuentemente aislada en muestras de suelo de olivar es *B. bassiana*, presente en el 70-80% de las muestras, seguida por *M. anisopliae*, presente en un 20-30% de las mismas (Quesada-Moraga et al., 2007).



**Figura 10.** Larvas y adultos de insectos afectados por hongos entomopatógenos. (1). Larva de *Galleria mellonella* (Linnaeus F.) con síntomas de infección por hongos entomopatógenos. (2), Larva de *Phylophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) micosada por *Metarhizium anisopliae*. (3), Adulto de *Cyclocephala* (Coleoptera: melolonthidae) micosado por *Beauveria bassiana*.

#### **2.3.2.1.4. Ascomicetos mitospóricos entomopatógenos y el control de tefritidos**

Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) penetran en los hospedantes susceptibles a través del tegumento, los que les confiere el mayor potencial para el control de plagas de tefritidos, al poder ser utilizados tanto para el control de adultos en aplicaciones aéreas, como el de larvas de última edad próximas a pupación y pupas en tratamientos de suelo, en la base del árbol (Ekesi et al., 2007, Quesada-Moraga et al., 2006; 2008a).

Al igual que los tratamientos químicos, las estrategias de control de adultos con AME se basan en tratamientos de pulverización del árbol (Daniel, Wyss, 2010), o mediante la estrategia de atracción e infección que se fundamenta en el empleo cebo compatible con los AME (Ekesi et al., 2007, Quesada-Moraga et al., 2008a). De esta manera el HE + cebo se pueden pulverizar en una

parte del árbol o dispensarse mediante un dispositivo colocado en una parte de éste. El insecto al posarse fortuitamente sobre la vegetación o los frutos del árbol o al ser atraído por el cebo entra en contacto con las esporas del hongo y se infecta. Además, puesto que los AME pueden transmitirse horizontalmente, es decir de un individuo a otro, los insectos infestados pueden diseminar las esporas adheridas a su cutícula a otros individuos (Quesada-Moraga et al., 2008b), lo que sin duda aumenta el potencial de biocontrol de los AME frente a *B. oleae* (Fig. 11).

Por otro lado, las hembras tratadas con HE son menos fecundas que su homólogas no tratadas (Castillo et al., 2000, Quesada-Moraga et al., 2006) por lo que el tratamiento con AME incide en el número de frutos picados y en el número de individuos de la generación siguiente. No obstante, para que la aplicación de AME en

combinación con cebos o no, sea un método de control de *B. oleae* robusto es necesario mejorar la producción y formulación de los conidios para aportar suficiente inóculo en los tratamientos, evitar la inactivación de los conidios por la radiación ultravioleta y favorecer la adhesión de los mismos a los insectos (Ekesi et al., 2007).

El suelo confiere a los AME protección frente a la radiación ultravioleta y a los cambios bruscos de temperatura, estudios realizados por Bruck (2005), con *M. anisopliae* indican alta persistencia de los

conidios del hongo en la rizosfera de la planta mejorando su actividad, además en el entorno rizosférico el recurso de carbono libre es más abundante y es aprovechado por los microorganismos. Por otra lado las moscas de la fruta pasan una parte de su vida en el suelo, primero como larva de última edad próxima a pupación y después en estado de pupa, por lo que la aplicación de AME en el suelo puede ser una alternativa más para el control de estas especies (Quesada-Moraga et al., 2006, Ekesi et al., 2007, Garrido-Jurado, et al., 2011a).



**Figura 11.** Adultos y puparios de *C. capitata* infectados por *Metarhizium brunneum* y *Beauveria bassiana*. (1,3), Adulto y pupario infectado por *M. brunneum*. (2,4), Adulto y pupario infectado por *B. bassiana*.

Experimentos recientes en laboratorio muestran que la aplicación de conidios de los HE *B. bassiana* y *M. anisopliae* al suelo

causa una elevada mortalidad de pupas de varias especies de tefrítidos y por lo tanto se reduce significativamente el porcentaje de emergencia de adultos (Ekesi et al., 2002, Ekesi et al., 2003, Quesada-Moraga et al., 2006, Garrido-Jurado, et al., 2011b). Igualmente se ha determinado que los hongos entomopatógenos como *M. brunneum* y *B. bassiana* pueden seguir actuando en adultos que han emergido de puparios tratados (inoculados) causando mortalidad a los adultos recién emergidos evitando así que lleguen a su etapa reproductiva (Lozano-Tovar et al., 2013).

#### **2.3.2.1.4.1. Los extractos secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos y control de tefrítidos**

Los microorganismos son la base actual de numerosos bioinsecticidas, definidos aquellos insecticidas cuya materia activa es un organismo o sus productos (productos del metabolismo de

animales, microorganismos y plantas) (Philogenè et al., 2004). Se conocen dos grandes grupos de metabolitos insecticidas secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos, los de bajo peso molecular (aprox. <5 kDa), denominados también metabolitos secundarios, que son sintetizados en su mayor parte en grandes complejos multienzimáticos citoplásmicos y no en ribosomas, así como los metabolitos proteicos macromoleculares (> 5-10 kDa), de naturaleza proteínica (Vey et al., 2001). Los compuestos secretados por los hongos entomopatógenos han recibido mucha atención durante los últimos años tanto por su función como factores de virulencia como para su desarrollo como nuevas moléculas insecticidas de origen natural (Vey et al., 2001; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

#### **2.3.2.1.4.1.1 Los metabolitos proteínicos macromoleculares insecticidas**

La cutícula de los insectos es una estructura consistente en nanofibras de quitina cristalina integrada a una matriz de proteínas, polifenoles, agua y pequeñas cantidades de lípidos (Chapman, 2012, Vincent y Wegst, 2004), por lo que no resulta sorprendente que los hongos entomopatógenos durante el proceso infectivo produzcan, entre otras enzimas, lipasas, proteasas (i.e. Pr1: subtilisina, Pr2: tripsina, Pr4: proteasa Cisteína), glucanasas (i.e.  $\beta$ -1,3 glucanasas), quitinasas y lipasas implicadas en la degradación de la cutícula y en la penetración a través del tegumento (Khachatourians, 1996; Seidl, 2008; Ali et al., 2014). Además la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico (Shoaib et al., 2012, Sánchez-Pérez et al., 2014).

A pesar de la existencia de un buen número de trabajos sobre la

función de estas enzimas como factores de virulencia, e incluso como dianas para el diseño de cepas fúngicas transgénicas mejoradas en su expresión, no son tan abundantes las referencias a las proteínas insecticidas secretadas por los hongos entomopatógenos. La primera molécula totalmente purificada, Hirsutelina A (Mazet y Vey, 1995), es una proteína de 15 KDa producida por el hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher, que presenta efectos letales al ser aplicada per os sobre adultos de *Drosophila melanogaster* L. y larvas de mosquitos. La otra molécula de alto peso molecular purificada es la Bassiacridina (Quesada-Moraga y Vey, 2004), que es una proteína de 60 KDa producida por un aislado de *B. bassiana* y que resulta activa contra ninfas de Ortópteros Acrididos: *Locusta migratoria* (L.), *Schistocerca gregaria* Förskal y *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg). Ambas proteínas

parecen desempeñar un papel en el proceso patogénico del hongo en su insecto hospedante, aspecto que ha recibido más atención que su posible empleo como insecticidas (Mazet y Vey, 1995; Quesada-Moraga y Vey, 2004). Sin embargo, las moléculas de naturaleza proteínica presentan propiedades excelentes para su desarrollo como insecticidas. Proceden de la síntesis ribosomal, y por tanto, sus genes pueden ser aislados y clonados. Esto permite utilizar las “fábricas celulares” de que disponemos en la actualidad (p.e. *Escherichia coli* (Escherich) para producir la proteína a escala, e incluso, introducir los genes insecticidas en cultivos de gran interés agrícola

Investigaciones realizadas por Ortiz-Urquiza et al. (2009; 2010a; 2013), muestran el uso potencial de proteínas obtenidas del hongo *M. anisopliae* (EAMa 01/58-Su) para el control de *C. capitata* con efectos antiapetitivos, deterioro del sistema

digestivo y mortalidad de adultos cuando fueron administradas por vía oral. Igualmente la evaluación de extractos proteicos obtenidos de cepas de *B. bassiana* (EABb 01/103-Su, EABb 01/12-Su, EABb 01/88-Su y EABb 01/110-Su) en diferentes medios de cultivo mostró la producción de enzimas tanto *in vivo* como *in vitro*, las cuales estuvieron involucradas en la degradación de la cutícula de los insectos tratados (Ortiz-Urquiza, et al., 2010b). Extractos crudo obtenidos de *M. brunneum* (Petch) EAMB 09/01-Su y evaluados sobre adultos de *B. oleae* y *C. capitata* han mostrado ser eficientes con mortalidades cercanas 80% (Yousset et al., 2013; 2014, Lozano-Tovar et al., 2015). Finalmente se puede afirmar que los hongos entomopatógenos cuenta con una alta capacidad para producir diversas proteínas que le permiten infectar diferentes órdenes de insectos y favorecen su

persistencia en diversos nichos agroecológicos.

#### **2.3.2.1.4.1.2. Metabolitos secundarios insecticidas**

Los hongos entomopatógenos poseen también la capacidad de sintetizar compuestos de bajo peso molecular, que pueden estar implicados en el proceso infeccioso, y cuyas propiedades insecticidas también han sido puestas de manifiesto. En general los metabolitos secundarios están asociados a distintas fases morfológicas del ciclo de vida del microorganismo y son producidos bajo condiciones específicas del ambiente como pH, temperatura, y nutrición. Los metabolitos secundarios comprenden una amplia variedad de estructuras químicas y son clasificados de acuerdo a las moléculas precursoras del metabolismo primario. Los más estudiados son los llamados policétidos, los péptidos no

ribosomales (NRPs) y alcaloides (Fox y Howlett 2008).

Las funciones que cumplen los metabolitos secundarios son muy amplias, la mayoría de investigaciones muestran que su principal función es de protección contra el ambiente, permitiéndole al microorganismo sobrevivir en nichos especiales. Los policétidos son sintetizados por polimerización de subunidades de acetilo y propionilo por la policétido sintetasa, estos compuestos tienen actividades biológicas diversas, se conocen antibióticos, antifúngicos, anticolesterolémicos, antiparasíticos, promotores del crecimiento animal e insecticidas (Teichert y Nowrousian, 2011). Los péptidos no ribosomales son sintetizados por enzimas llamadas péptido sintetasa no ribosomales (NRPs, por sus siglas en inglés), por tanto la síntesis de estos compuestos, es independiente de RNA mensajero. En su gran mayoría

cuentan con estructuras cíclicas y algunos tienen estructuras ramificadas. Es un grupo de metabolitos muy amplio, cumplen diversas funciones como antibióticos e inmunosupresores, insecticidas y antialimentarios. Los genes que codifican se han encontrado en hongos y bacterias pero no en animales y plantas. Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen nitrógeno, sintetizados a partir de aminoácidos. Los alcaloides son producidos por muchos organismos, igual que los anteriores compuestos presentan alta diversidad química y actividad biológica (Hoffmeister y Keller, 2007). Algunos alcaloides son producidos por microorganismos endófitos, tal es el caso de la peramina y lolinas aisladas de cultivos de *Neotyphodium coenophialum*, *N. lolii*, *Epichloë festucae* y *E. typhina* los cuales han demostrado tener actividad insecticida protegiendo a su

hospedero del ataque de insectos (Spiering et al., 2005).

Especies de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* producen ciclodepsipéptidos como las beauvericinas y destruxinas que tiene una fuerte actividad insecticida contra un rango amplio de insectos considerados plagas. La toxicidad de ambos grupos de metabolitos es atribuida principalmente a la actividad contra la membrana celular, formando complejos ionofóricos y lipofílicos.

La **Beauvericina**, consiste en un ácido D - $\alpha$  hydroxi -isovalerico, alternando un residuo de aminoácido unido por un péptido y un enlace éster, consta de tres residuos aromáticos constituidos por N- metilfenilalanina. Beauvericina forma complejos con el sodio y el potasio, que incrementa la permeabilidad natural de la membrana celular induciendo la deshidratación de los tejidos por pérdida de líquido de las células,



también puede producir alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis, así como en la fecundidad, es secretada principalmente por *Beauveria bassiana* y se ha comprobado que tiene actividad insecticida contra larvas de los mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus) (el mosquito de la fiebre amarilla) y frente a la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferreri) Coleoptera: Curculionidae, produciendo parálisis después de 6 horas de tratamiento y un 73% de mortalidad después de 72 horas (Boucias et al., 1994, Borges et al., 2010). También se ha demostrado que es tóxica para larvas de *Spodoptera frugiperda* (Fornelli et al., 2004).

Otros metabolitos producidos por *Beauveria* spp son **Bassianolide**, un ciclo-octadesipéptido que induce pérdida del tono muscular y es letal en larvas en dosis de 13 ppm, tiene propiedades ionofóricas que

reacciona con diferentes cationes (Vey et al., 2001). Mientras que la **Oosporeina** es el mayor metabolito producido por *Beauveria brongniartii*, es también producida por un gran número de hongos de suelo, éste compuesto actúa sobre proteínas y aminoácidos a través de reacciones redox, alterando los grupos SH, por lo cual altera la función de las enzimas (Vey et al., 2001). La Oosporeina fue identificada en el ascomicete *B. bassiana* hace más de 50 años. Esta toxina es producida por diferentes hongos patógenos de plantas y por endófitos. Ensayos insecticidas han revelado que la oosporeina es un factor de virulencia y actúa inhibiendo el sistema inmune del insecto permitiendo la multiplicación del hongo en los insectos (Feng et al., 2015).

**Las efraeptinas** son compuestos producidos por especies del género *Tolypocladium*, que también han mostrado poder

biocida por inyección, así como efecto insecticida y antiapetitivo al ser aplicados por ingestión o contacto sobre lepidópteros y coleóteros (Bandani y Butt, 1999). Estos compuestos inhiben la actividad ATPasa en las mitocondrias.

**Las destruxinas (dtxs)**, secretadas en su gran mayoría por especies del género *Metarhizium* son probablemente las que mayor atención han recibido por sus propiedades insecticidas. Son metabolitos de bajo peso molecular, compuestos por un  $\alpha$  hidróxido-ácido y residuos de cinco aminoácidos prolina, isoleucina, metilvalina, metilalanina y beta-alanina. Las destruxinas presentan una amplia gama de actividades biológicas entre las cuales están sus propiedades insecticidas, citotóxicas, antibióticas, anti-inflamatorias y anticancerígenas (Molnár, et al., 2010, Liu y Tzeng,

2012). Se han descrito alrededor de 39 dtxs (Tabla 1), las cuales han sido aisladas de cultivos de *Aschersonia aleyrodis* (Webber), *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc., *Beauveria felina* (DC.) J.W. Carmch, *Nigrosabulum globosum* (Malloch y Cain) y *Metarhizium* spp (Liu y Tzeng, 2012). Las destruxinas A<sub>4</sub>, A<sub>1</sub> y A<sub>5</sub> y la homodestruuxina B han sido aisladas del hongo entomopatógeno *Aschersonia* sp (Krasnoff y Gibson, 1996). También la dxt B, la homodestruuxina B y la desmitildestruxina B han sido aisladas de los hongos fitopatógenos *A. brassicae*, *Trichothecium roseum* (Pers.) Link y *Ophiosphaerella herpotricha* (Fr.) J. Walker (Parada et al., 2007, Wang et al., 2012).

Las masas moleculares de estos compuestos están comprendidas entre 563 y 725 [M + H]<sup>+</sup>. Entre las más referenciadas esta dtx A (578), dtx B (594), dtx C (610),

dtx D (624), dtx E (594), dtx A<sub>1</sub> (592), dtx A<sub>2</sub> (564) (Jegorov, et al., 1998).

Respecto a su actividad insecticida, las destruxinas exhibe propiedades ionofóricas, induciendo la formación de poros en las membranas celulares, transportando iones a través de la membrana a la fase lipofílica, formando complejos con calcio, afectando el balance celular, lo que conlleva a una depolarización de la membrana e inhibiendo la síntesis del DNA, RNA y las proteínas en las células de los insectos, especialmente en el intestino (Liu y Tzeng, 2012). Las destruxinas destruyen las mitocondrias, inhiben la secreción de los fluidos de los tubos de Malpighi y anulan la respuesta inmune en la hemolinfa de los insectos, lo cual al parecer favorece la micosis en los insectos (Mustafa y Kaur, 2013).

Estudios han demostrado que dtxs pueden suprimir la actividad hidrolítica de la ATPasa de tipo V en

*Galleria mellonella* y causan estrés oxidativo en *Spodoptera litura*. Se ha determinado que las destruxinas pueden suprimir la respuesta inmune de los insectos, alterando los procesos de encapsulación y la fagocitosis de los hemocitos (Han et al., 2013). También tienen propiedades antialimentarias y pueden ser absorbidas a través de la cutícula de los insectos (Amiri et al., 1999). Algunos estudios reportan que pueden ser tóxicas para mamíferos pequeños, siendo menos tóxicas para peces y anfibios (Vey et al., 2001). Las destruxinas A-E (Fig. 12), han sido las más estudiadas por su actividad insecticida.

La susceptibilidad de los insectos a las destruxinas es variable también, pero en general las dtxs A y E parecen ser más tóxicas que las dtxs D y B en larvas de *Galleria*, igualmente estudios han mostrado que larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), son

más sensibles a la destruxina E que a las dtxs A o B (Vey et al., 2001).

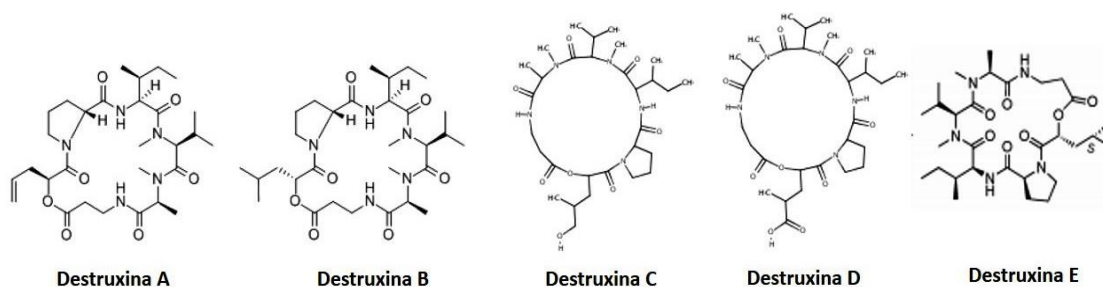
Thomsen y Eilenberg (2000), estudiaron el efecto de la dtxs A y E sobre larvas *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) y encontraron que *P. brassicae* fue más susceptible a las dtxs, siendo la dtx E más efectiva que la dtx A. Estudios realizados con la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) determinaron que las ninfas son moderadamente susceptibles a las dtxs, siendo más efectiva la dtx A que la dtx B y en el mismo estudio no observaron efectos ovicidas o disuasivos de la oviposición (Hu et al., 2009)

La dtx A ha sido evaluada sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), ésta afecta el funcionamiento de los tubos de Malpighi (Ruiz- Sánchez et al. 2010). Mientras que Rizwan-ul-Haq et al. (2009), encontró que la dtx B es un

insecticida efectivo contra *Spodoptera litura* (Fab) con una  $EC_{50}$  de 0.17 mg/ml. Sin embargo estudios comparativos de Xiang et al. (2011), con las dtx A y B, mostraron que *Spodoptera litura* fue más susceptible a la dtx A con  $CI_{50}$  de 7.8  $\mu$ g/ml mientras que la  $CI_{50}$  de la dtx B fue de 20.7  $\mu$ g/ml. Igualmente Hu et al. (2007), evaluó la actividad insecticida de la destruxina A sobre *Spodoptera litura*, encontrando mortalidad del 65% a las 96 h después de tratadas con una concentración de 300 ppm. La actividad acaricida de las dtx Ed<sub>1</sub>, Pseudodtx C y hydroxyhomodtx B, ha sido evaluada sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con resultados promisorios encontrándose resultados superiores a ciertos acaricidas comerciales (Morais-Urano et al. 2012).

**Tabla 1.** Grupos de destruxinas y referencias relacionadas con su bioactividad (Liu y Tzeng, 2012).

Grupo de destruxinas	destruxina	bioactividad
<b>Subgrupo A</b>		
1	DA	Insecticida:
2	DA <sub>1</sub>	<i>Agrotis segetum</i> , <i>Artemia salina</i> <i>Daphnia magna</i> ,
3	DA <sub>2</sub>	<i>Bemisia tabaci</i> ,
4	DA <sub>3</sub>	<i>Drosophila melanogaster</i> ,
5	DA <sub>4</sub>	<i>Spodoptera frugiperda</i> ,
6	DA <sub>5</sub>	<i>Spodoptera litura</i> ,
7	DA <sub>4</sub> chlorohydrin	<i>Ceratitidis capitata</i> .
8	Desmethyl DA	Inhibición de la V-ATPasa.
9	Dihydro DA	
10	Pseudo DA	Induce la expresión de la eritropoyetina.
<b>Subgrupo B</b>		
11	DB	Insecticida: <i>Bemisia tabaci</i> , <i>Brassica juncea</i> ,
12	DB <sub>1</sub>	<i>Cydia pomonella</i> ,
13	DB <sub>2</sub>	<i>Spodoptera frugiperda</i> ,
14	Desmethyl DB	<i>spodoptera litura</i> .
15	Desmethyl DB <sub>2</sub>	Acaricida.
16	Homo DB	Citotoxicidad tumoral.
17	Proto DB	Fitotoxicidad.
18	Hydroxy DB	
19	Hydroxyhomo DB	
20	β-D- Glucopyranosyl- hydroxyl DB	
21	[Ph <sup>3</sup> ,N-Me-Val <sup>5</sup> ] DB	
22	Pseudo DB	
<b>Subgrupo C</b>		
23	DC	
24	DC <sub>2</sub>	
25	Desmethyl DC	
26	Pseudo DC	
<b>Subgrupo D</b>		
27	DD	Efectos antialimentarios
28	DD <sub>1</sub>	
29	DD <sub>2</sub>	
<b>Sugrupo E</b>		
30	DE	Insecticida: <i>Agrotis segetum</i> , <i>Pieris brassicae</i> , <i>Cydia pomonella</i> , Leukemic cell HL60, <i>Salmonella typhimurium</i> . <i>Musca domestica</i> .
31	DE <sub>1</sub>	
32	DE <sub>2</sub>	
33	DE chlorohydrin	
34	DE <sub>2</sub> chlorohydrin	
35	DE diol	
36	DEd <sub>1</sub>	acaricida
37	[B-Me-Pro]DE chlorohydrin	Citotoxicidad tumoral.
38	Regioisomer of DE chlorohydrin	Inhibición de la V-ATPasa.
<b>Subgrupo F</b>		
39	DF	



**Figura 12.** Estructura de las destruxinas A-E.

La destruxina B ha resultado ser un metabolito de importancia porque, además de su actividad insecticida, presenta actividad anticancerígena, aunque también se ha citado con actividad fitotóxica (Chun-chi et al., 2013).

Del mismo modo la capacidad de los insectos a la desintoxicación de las dtxs es variable. Hay evidencia de que los insectos pueden eliminar dtxs, así estudios con destruxina E en *Locustra migratoria* demostraron que es convertida en destruxina E-diol que es inactiva cuando se inyecta en *Galleria mellonella*, de igual manera la destruxina A se transforma en un

péptido lineal polar no activo (Loutelier et al., 1995).

La producción de destruxinas por el género *Metarhizium in vivo* y *in vitro* muestra alta variación inter e intraespecífica, esta variación puede estar relacionada con la virulencia o con la especificidad hacia el insecto hospedante. La mayoría de cepas virulentas producen grandes cantidades de destruxinas, pero también existen cepas muy virulentas con baja producción de destruxinas (Amiri-Besheli et al., 2000, Zimmermann, 2010). Además, la producción de dtxs está influenciada por factores tanto biológicos como fisicoquímicos, como los nutrientes del insecto o por

los componentes del medio de cultivo, en particular el pH, la aireación y la relación de carbono: nitrógeno (Mustafa y Kaur, 2013). Wang et al. (2004) demostraron incrementos en la producción de dtxs A, B y E con incrementos en los contenidos de peptona en el medio.

Igualmente el tiempo de fermentación tiene gran influencia, en este mismo estudio, se encontró que cultivos de 18 días registraron los más altos contenidos de dtxs A y B comparados con cultivos de 3 días de fermentación. La producción de dtx también se ve afectada por el tamaño de los gránulos de los hongos durante el cultivo. De acuerdo a Feng et al. (2004), un tamaño adecuado de pellets está alrededor de 2.0 mm para *M. anisopliae*. Además el pH del cultivo es también un importante parámetro que influye en los procesos de crecimiento de los hongos y en la producción de metabolitos secundarios. Wang et al.

(2004), encontraron que el pH inicial del medio de cultivo afecta la producción de destruxinas, la producción de dtx B fue limitada cuando el pH inicial del medio estuvo por debajo de 5, en contraposición la producción máxima de dtx B fue mayor a pH 9.

La aireación del medio de cultivo es otro factor importante en la producción de dtxs, igualmente la manipulación del medio de cultivo puede promover una mayor producción de metabolitos secundarios. Rao et al. (2006), encontraron que la adición de vitamin K3 mejoró la producción de dtx E, así mismo la adición de ácido pipercolico aumento la producción de dtx A, B y E (Espada y Dreyfuss, 1997).

Otros compuestos análogos a las destruxinas han sido descritos como roseotoxin, bursefalocidos A y B. Además de la producción de destruxinas en el género *Metarhizium* se ha determinado la

producción de citocalasinas (C y D), swainsoninas e hydroxifungerinas, ácido helvolico, serinocuclinas, aurovertinas y tyrosina betaina (Uchida et al., 2005, Zimmermann, 2010). Las citocalasinas son metabolitos fúngicos que tienen la capacidad de unirse a los filamentos de actina e interfieren con la polimerización y el alargamiento de la actina. Como resultado de la inhibición de la polimerización de la actina, citocalasinas pueden cambiar la morfología celular, inhiben procesos celulares tales como la división celular e incluso causan apoptosis. Las citocalasinas también pueden tener un efecto sobre otros aspectos de los procesos biológicos no relacionados con la polimerización de actina. Por ejemplo, citocalasina A y citocalasina B también puede inhibir el transporte de monosacáridos través de la membrana celular, la citocalasina D inhibe la síntesis de proteínas y la

citocalasina E impide la angiogénesis.

Respecto a la evaluación insecticida de metabolitos secundarios secretados por ascomicetos mitospóricos entomopatógenos frente a moscas de la fruta, extractos de *M. anisopliae* han sido evaluados frente a adultos de *C. capitata*, con valores de mortalidad superiores al 90% (Castillo et al., 2000), igualmente extractos de *M. brunneum* han sido evaluados frente a adultos de *C. capitata* y *B. oleae* con mortalidades del 80% (Yousef et al., 2013; 2014). Se ha demostrado que la cepa de *M. brunneum* EAMb 09/01-Su tiene la capacidad de producir destruxinas A y A<sub>2</sub>, las cuales son tóxicas para adultos de *C. capitata* alcanzando mortalidades del 100% a las 48 horas después del tratamiento (Lozano-Tovar et al., 2015).



## 2.4. Referencias bibliográficas.

- Alberola, T. M., S. Aptosoglou, M., Arsenakis, Y. Bel, G., Delrio, D. J., Ellar, J., Ferré, F., Granero, DM., Guttman, Koliais, S., Martínez-Sebastián, MJ., Prota, R., Rubino, S., Satta, A., Scarpellini, G., Sivropoulou, A., Vasara, E. 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *Journal Invertebrate Pathology* 74: 127-136.
- Alfaro, A. 2005. Segunda parte. Orden Díptera. Fam. Tephritidae. *Dacus oleae* (Gmel), pp. 196 -198. In *Entomología agrícola, los parásitos de las plantas cultivadas*. Excma. Diputación provincial de Soria, España.
- Ali, S., Huang, Z., Ren, S.X. 2009. Production and Extraction of Extracellular Lipase from the Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosoroseus* Cordycipitaceae: Hypocreales). *Biocontrol Sciences Technology*. 19: 81-89.
- Aluja, M., Pérez -Stapñes, D., Macías-Ordoñez, R., Piñero, J., McPherson, B., Hernández-Ortiz, V. 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 96: 1693-1703.
- Amiri-Besheli, B., Ibrahim, L., Butt, T., 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pest. *Biocontrol Sci Techn.* 9, 487-498.
- Badii, K., Billah, M., Afreh-Nuamah, K., Obeng-Ofori, D., Nyarko G. 2015. Review of the pest status, economic impact and management of fruit infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. *African Journal of Agricultural Research* 10:1488-1498.
- Bandani, A.R., Butt, T.M. 1999. Insecticidal, antifeedant and growth inhibitory activities of efrapeptins, metabolites of the fungus *Tolyposcladium*. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 499-506.
- Bautista, R.C., Mochizuki, N., Spencer, J.P., Harris, E.J., Ichimura, D.M., 1999. Mass-rearing of the tephritid fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*. 15: 137-144.
- Berlitz, D., Giovenardi, M., Fiuza, L. 2006. Toxicology effect of  $\delta$ -endotoxins and  $\beta$ -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in Wistar rats. *Neotropical Biology and Conservation*. 1: 35-38.
- Borges, D., Díaz, A., San Juan, A., Gómez E. 2010. Hongos entomopatógenos. *ICIDCA*. 49-55.
- Boucias, D. G., Bradford, D.L., Barfield, C. S. 1994. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomurea rileyi*: Effects of pathotype, dosage, temperature, and host age. *Journal of Economic Entomology*. 77: 247-253.
- Bruck, D. 2005. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soil less potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biological Control*. 32: 155-163.
- Caballero, P., Williams, T. 2008. Virus entomopatógenos. En: *Control biológico de plagas*

- agrícolas. Jacas, J. y Urbaneja, A. (Eds). Phytoma 121-135 pp.
- Castillo, M.A., Moya, P., Hernández, E., Primo-Yúfera, E. 2000. Susceptibility of *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biological Control*. 19: 274-282.
- Chapman, R. F. 2012. *The Insects Structure and Function*. 5th Edition. Ed. By Stephen J. Simpson, Angela E. Douglas. Cambridge University Press.
- Chun-Chi, W., Tzu-Hsiu, Ch., Bing-Lan, L., Li-Chen, W., Yung-Ching, Ch., Yew-Min, T., Shih-Lan, H. 2013. Destruxin B Isolated from Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Induces Apoptosis via a Bcl-2 Family-Dependent Mitochondrial Pathway in Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Article ID 548929, doi:10.1155/2013/548929.
- Daane, K., Johnson, M., Lynn-Patterson, K., Nadel, H., Opp. S., Stewart-Leslie, J., Wang, X. 2011a. High temperature affects olive fruit fly populations in California's Central Valley. *California Agriculture*. 65: 29-33.
- Daane, K., Johnson, M., Pickett, Ch., Sime, K., Wang, X., Ndel, H., Andrew, J., Hoelmer, K. 2011b. Biological controls investigated to aid management of olive fruit fly in California. *California Agriculture* 65: 21-28.
- Daane, K., Wang, X., Nieto, D., Pickett, Ch., Hoelmer, K., Blanchet, A., Johnson, M. 2015. Classic biological control of olive fruit fly in California, USA: release and recovery of introduced parasitoides. *BioControl*. 60: 317-330.
- Daane, KM., Johnson, MW. 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern time. *Annual Review of Entomology*. 55: 151-169.
- Daniel, C., Wyss, E. 2010. Field applications of *Beauveria bassiana* to control the European Cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi*. *Journal of applied Entomology*. 134: 675-681.
- Ekesi, S., Dimbi, S., Maniania, NK. 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of tephritid fruit flies (Diptera:Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa, in *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*, ed.by Ekesi S & Maniania NK. Research Sigpost, Kerala India 239-274 pp
- Ekesi, S., Maniania, NK., Lux, SA. 2002. Mortality in three African tephritid fruit by puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*. 12: 7-17.
- Ekesi, S., Maniania, NK., Lux, SA. 2003 Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four Tephritidae fruit fly puparia. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 157-167.
- Elleuch, J., Tounsi, S., Hassen, B., Lacoix, MN., Chandre, F., Jaoua, S., Zghal, RZ. 2015. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae).

- Journal of Invertebrate Pathology. 124: 90-97.
- Espada, A., Dreyfuss, MM. 1997. Effect of the cyclopeptolide on the production of destruxins and helvolic acid by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 19: 7-11.
- Faiza, I., Nassira, G., Kanza, M., Mireille, K. 2013. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* on Larvae and Adults of *Bactrocera oleae* *Gmelin* (Diptera: Tephritidae). Journal of Environmental Protection. 4: 480-485.
- FAO, 2011. "Field Exercise Guides on Fruit Flies Integrated Pest Management. Asian Fruit Fly IPM Project Bangkok, Thailand. <http://www.ait.ac.th/research/workshop-reports/field-exercise-guide-on-fruit-fly-ipm-n.pdf>.
- Feng, KC., Rou, TM., Liu, BL., Tzeng, YM., Chang, YN. 2004. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. Enzyme Microbiology and Technology. 34: 22-25.
- Feng, P., Shang, Y., Cen, K., Wang, C., 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112: 11365-11370.
- Feng, P., Shang, Y., Wang, Ch. 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. PNAS. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503200112>.
- Fornelli, F., Minervini, F., Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). Journal of Invertebrate Pathology 85: 74-79.
- Fox, E., Howlet, B. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Microbiology. 11: 481-487.
- Garrido-Jurado, I., Ruano, F., Campos, M., Quesada-Moraga, E. 2011a. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. Biological Control. 59: 239-244
- Garrido-Jurado, I., Torrent, J., Barron, V., Corpas, A., Quesada-Moraga, E., 2011b. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Biological Control. 58: 277-285.
- Gazit, Y., Rossler, Y., Glazer, I. 2000. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Science and Technology. 10: 157-164.
- Goettel, MS, Eilenberg, J., Glare, TR. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. EN: Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S. (Eds), Comprehensive Molecular Insect Science, Elsevier, Boston, 361-406 pp.
- Gryganskyi, A., Humber, R., Smith, M., Miadlikovska, J., Wu, S., Voigt, K., Walther, G., Anishchenko, I., Vilgalys, R. 2012. Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. Molecular Phylogenetics and Evolution. 65: 682-694.
- Gucci, R., Caruso, G., Canle, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., Taticchi, A., Esposito, S., Servili, M. 2012. Qualitative Changes of olive oils, obtained

- from fruits damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *HortScience* 47: 301-306.
- Haidle, A., Myers, A., 2004. An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: Synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Chemistry*. 101: 12048-12053.
- Hajeck, A., Leger, St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- Han, P., Jin, F., Dong, X., Fan, J., Qiu, B., Ren S. 2013. Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PLoS ONE* 8(4): e60771. doi:10.1371/journal.pone.0060771.
- Haniotakis, G. 2005. Olive pest control: present status and prospects. *Iobc/wprs bull.* 28: 109.
- Hernández-Ortiz, V. 2003. Familia Tephritidae: Clasificación actual, relaciones filogenéticas y distribución de taxa americanos. En: Memorias del XV Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta, Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la fruta, Programa MOSCAMED-MOSCAFRUT SAGARPA-IIICA. Metapa de Domínguez, Chiapas. 11-23 pp
- Hernández-Ortiz, V., Aluja, M. 1993. Listado de especies del genero neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana* 88: 89-105.
- Hernández-Ortiz, V., Morales-Valles, P. 2004. Distribución geográfica y plantas hospederas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) en Venezuela. *Folia Entomologica Mexicana*. 43: 181-189.
- Hoffmeister, D., Keller, N. P. 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports* 24: 393-416.
- Hu, QB., An, XC., Jin, FL., Freed, S., Ren, SX. 2009. Toxicities of destruxins against *Bemisia tabaci* and its natural enemy, *Serangium japonicum*. *Toxicon*.53:115-21.
- Humber, RA. 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120: 477-492.
- Imoulan, A., Alaoui, A., El Meziane, A. 2011. Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. *World Journal microbiology Biotechnology*. 27: 2619-2628.
- Jegorov, A., Havlicek, V., Sedemera, P. 1998. Rapid Screening of destruxinas by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 33: 274-280.
- Kakani, E.G., Ioannides, I.M., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A., Mathiopoulos, K.D. 2008. A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 781-787.
- Kakani, E.G., Zygouridis, N.E., Tsoumani, K.T., Seraphides, N., Zalom, F. G., Mathiopoulos, K.D. 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae*

- (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Management Sciences*. 66: 447-453.
- Kepenekci, I., Hazir, S., Ozdem, A. 2015. Evaluation of native entomopathogenic nematodes for the control the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) larvae in soil. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 39: 74-79.
- Khachatourians, G. G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *Human and animal relationships* (pp. 331-363). Springer Berlin Heidelberg.
- Khoo, C., Lawrence, P. 2002. Hagen's glands of the parasitic wasp *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): ultrastructure and the detection of entomopoxvirus and parasitism-specific proteins. *Arthropod Structure & Development*. 31:121-130.
- Kirk, P., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn. CAB International, Wallingford, UK.
- Kirkland, B., Eisa, A., Keyhani, N. 2005. Oxalic acid as a fungal acaricidal virulence factor. *Journal of Medical Entomology*. 42: 346-351.
- Klassen, W., Lindquist, D.A., Buyckx, E.J. 1994. Overview of the Joint FAO/IAEA Division Involvement in Fruit Fly Sterile Insect Technique Programs. In *Fruit flies and the Sterile Insect Technique*, edited by C. O. Calkins, W. Klassen and P. Liedo CRC Press, Boca Raton. 3-26 pp
- Krasnoff, S., Gibson, D.M. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *Journal Natural Product*. 59: 485-489.
- Krasnoff, S., Gupta, S. 1994. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* Var. *Synnematosa*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 293-302.
- Laurence, P., Matos, L. 2005. Transmission of the *Diachasmimorpha longicaudata* rhabdovirus (DIRhV) to wasp offspring: an ultrastructural analysis. *Journal of Insect Physiology*. 51: 235-241.
- Levison, H.Z., Levison, A.R. 1985. Botanical and chemical aspects of the olive fruit with regards to host acceptance and utilization by *Dacus oleae* (Gmel). En *Integrated Pest Control in Olive*. Cavalloro R. & Croveti A. (Ed.) 49-62 pp.
- Liquido, N.J., Chan, H.T., Jr., McQuate, G.T. 1995. Hawaiian tephritid fruit flies (Diptera): integrity of the infestation-free quarantine procedure for 'Sharwil' avocado. *Journal of Economic Entomology*. 88: 85-96.
- Liu B, Tzeng Y, 2012. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30: 1242-1254.
- Loutelier, C., Marcual, A., Cassier, P., Cherton, J.C., Lange, C. 1995 Desorption of ions from locust tissues. III. Study of a metabolite of A-destruxin using fast-atom bombardment linked-scan mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry* 9: 408-413.
- Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas, A., Quesada-Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-

- dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control* 67:409-420
- Lozano-Tovar, MD., Garrido-Jurado, I., Lafont, F., Quesada-Moraga, E. 2015. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal Economic Entomology*. 108: 462-472.
- Magana, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castanera, P. 2007. Resistance to Malathion in Field Populations of *Ceratitis capitata*. *Journal Economic Entomology*. 100:1836-1843.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P. 2007. Resistance to malation in field populations of *Ceratitis capitata*. *Journal of Economic Entomology*. 100: 1836-1843.
- Margaritopoulos, J.T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A., Vontas, J. 2008. Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Management Science*. 64: 900-908.
- Mazet, I., Vey, A. 1995. Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiology*. 141:1343-1348.
- Mazomenos, B.E., Mazomenou, A.P., Stefanou, D. 2002. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC Bulletin*. 25: 1-11.
- Meyling, N. V., Hajek, A. E. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *BioControl*, pp.39-54.
- Meyling, N.V., Pell, J.K., Eilenberg, J. 2006. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal Invertebrate Pathology*. 93: 121-126.
- Miranda, M., Miquel, M., Terrassa, J., Melis, N., Monerri, M. 2008. Parasitism of *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae) by *Psytalia concolor* (Hymenoptera; Braconidae) in the Balearic Islands (Spain). *Journal of applied entomology*. 132: 798-805.
- Mishra, S., Kumar, P., Malik, A. 2013. Effect of process parameters on the enzyme activity of novel *Beauveria bassiana* isolate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2: 49-56.
- Mitchell, W.C., Saul, S.H. 1990. Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA. *Review of Agricultural Entomology* 78: 923-940.
- Montoya, P., Cancino, J., Ruiz, L. 2012. Packing of fruit fly parasitoids for augmentative releases. *Insect* 3: 889-899.
- Moon, Y., Donzelli, B., Krasnoff, S., McLane, H., Griggs, M., Cooke, P., Vandenberg, J., Gibson, D., Churchill, A., 2008. Agrobacterium-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 4366-4380.
- Morais-Urano, R., Chagas, A., Berlinck, R. 2012. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus)*

- microplus*. Experimental Parasitology. 132: 362-366.
- Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S., Bouaziz, M. 2010: Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. Food and Chemical Toxicology. 48: 3235-3241.
- Mueller, G. M. J., Schmit, P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? Biodiversity and Conservation 16:1-5.
- Mustafa, U., Kaur, G. 2013. Studies on destruxin production and toxicity by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ARSEF 2735. Kavaka 41: 68-74.
- Naranjo-Briceño, L., Rojas-Tortolero, D., González H., Torres-Parra, R., Zegarranarro, J., Sena, L., Sosa del Castillo D. 2010. *Arthrospira platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido pipercolico. Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental y Algal. 1: 64-90
- Neuenschwander, P., Michelakis, S. 1978. The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 86: 420-433.
- Olombrada, M., Martínez-del-Pozo, A., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J., García-Ortega, L. 2014. Fungal ribotoxins: Natural protein-based weapons against insects. 83: 69-74.
- Oroño, L.E., Albornoz-Medina, P., Núñez-Campero, S., Van Nieuwenhove, G.A., Bezdjian, L.P., Martin, C.B., Schliserman, P., Ovruski, S.M. 2006. Update of host Plant list of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* in Argentina. Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 207-225 pp.
- Ortiz-Urquiza, A., Vergara-Ortiz, A., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. 2010a. Insecticidal and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* culture supernatant protein extract on the Mediterranean fruit fly. Journal Applied Entomology: 134:581-591.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Borrego, A., Quesada-Moraga, E. 2010b. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). Pest Management Science. 66: 725-735.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. 2009. Purification and characterization of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pest Management Science. 65: 1130-1139.
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N., Quesada-Moraga, E. 2013. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic protein in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 23: 1199-1212.
- Papadopoulos, N. T., Katasoyannos, B.I., Kouloussis, N.A., Hendrichs, J., Carey, J.R., Heath, R.R. 2001. Early

- Detection and Population Monitoring of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in a Mixed-Fruit Orchard in Northern Greece. *Journal of Economic Entomology*. 94: 971-978.
- Papadopoulos, N. T., Katsoyannos, Byron, I., Carey, J.R. 2002. Demographic parameters of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) Reared in Apples. *Annals of the Entomological Society of America*. 95: 564-569
- Parada, R., Oka, K., Yamagishi, D., Kodama, M., Otani, H. 2007. Destruxin B produce by *Alternaria brassicae* does not induce accessibility of host plants to fungal invasión. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 48-54.
- Pell, J K., Hannam, J.J., Steinkraus, D.C. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl*, 55, pp.187-198
- Pina, T. 2008. Insectos parasitoides. En: control biológico de plagas agrícolas. Jacas, J.A. y Urbaneja, A. (Eds). *Phytoma* 98-119 pp.
- Quesada-Moraga, E., Álvarez-Santiago, C. 2008. Hongos entomopatógenos. En: Control biológico de plagas agrícolas. Jacas, J.A., Urbaneja, A. (Eds). *Phytoma España*. p. 98-120.
- Quesada-Moraga, E., Campos, M., Santiago, C. 2008a. Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía. *Conserjería de Agricultura y Pesca*. Capítulo 7. Control de plagas. 189-226 pp
- Quesada-Moraga, E., Campos-Aranda, M., Santiago-Álvarez, C. 2009. Control de plagas. En: *Sostenibilidad de la Producción de Olivar en Andalucía*. Gómez JA, (Eds). Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.. 189-324.
- Quesada-Moraga, E., Martín-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C. 2008b. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biology Control*. 47: 115-124.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J., Marahao, E., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*. 111: 947-966.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Álvarez-Santiago, 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., Vey, E. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycology Research*. 108: 441-452.
- Rehner, S.A. 2009. Molecular systematics entomopathogenic fungi. In S.P. Stock, J. Vandenberg, J., Glazer, I., Boemare, N. (Eds). *Insect pathogens: Molecular Approaches y Technique* Wallingford. CABI. 145-165 pp.
- Rice, R. 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly*. 10: 1-8.
- Rizwan-ul-Haq, M., Hu, QB., Hu, MY., Zhong, G., Weng, Q. 2009. Study of destruxin B and tea



- saponin, their interaction and synergism activities with *Bacillus thuringiensis* kurstaki against *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Applied Entomology and Zoology. 44: 419–28.
- Roy, H.E., Brodie, E.L., Chandler, D. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. BioControl. 55: 1–6.
- Ruiz-Sánchez, E., Lange, AB., Orchard, I. 2010a. Effects of the mycotoxin destruxin A on *Locusta migratoria* visceral muscles. Toxicon. 56:1043–51.
- Ruiz-Sánchez, E., Orchard, I., Lange, AB. 2010b. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). Toxicon. 55:1162–70.
- Sánchez-Pérez, L., Barranco-Flrido, J. E., Rodríguez-Navarro, S.; Cervantes-Mayagoitia, J. F., Ramos-López, M. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. Scientific Research. 2: 65- 76.
- Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. 2007. The olive fruit fly. Olea. Fao Olive. Network. 26: 60-61.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. American Journal of Botany. 99: 101-107.
- Seidl, V., 2008. “Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions”. Fungal Biol. Rev. 22: 36-42
- Serra, C., Ferreira, M., García, S., Santana, L., Castillo, M., Nolasco, C., Morales, P., Holler, T., Roda, A., Aluja, M., Sivinski, J. 2011. Establishment of the west Indian fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae) in the Dominican Republic. Florida entomologist. 94: 809-816.
- Shah P., Pell, J. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology Biotechnology. 61: 413-423.
- Shahid A., Rao, A., Bakhsh, A., Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. Archive Biological Science. Belgrade. 64: 21-42.
- Shoaib, F., Jin, F.L., Muhammad, N., Ren, S.X., Mubshar, H. 2012. Toxicity of Proteins Secreted by Entomopathogenic Fungi against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). International Journal of Agriculture and Biology. 14: 291-295.
- Sime, K., Daane, K., Kirk, A., Andrews, J., Johnson, M., Messing, R. 2007. *Psytalia ponerophaga* (Hymenoptera: Braconidae) as a potential biological control agent of olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) in California. Bulletin of Entomological Research. 97: 233–242
- Sivinski, J., Jeronimoe F., Holler, T. 2000. Development of Aerial Releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid that attacks the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae), in the

- Guatemalan Highlands. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 15-25.
- Spiering, M.J., C.D. Moon, H.H. Wilkinson, C.L. Schardl. 2005. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*. 169:1403-1414.
- Suarez, L., Murua, F., Lara, N., Escobar, J., Taret, G., Rubio, J., Van nieuwenhove, G., Bezdjian, L., Schliserman P., Ovruski, S. 2014. Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina: Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Fruit-Producing Semi-Arid Areas of San Juan. *Natural Science*. 6: 664-675.
- Sun, JY., Zhu, MZ., Wang, SW., Miao, S., Xie, YB., Wang, JB. 2007. Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine* 14:353-359.
- Teichert, I., Nowrousian, M., 2011. Evolution of genes for secondary metabolism in fungi. In: Evolution of fungi and fungal-like organisms. Pöggeler, S., Wöstemeyer, J. (Eds.). *Lodon New York*. 231-236 pp.
- Thomsen, L., Eilenberg, J. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. *Environmental Entomology*. 29:1041-7.
- Thomsen, L., Eilenberg, J. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. *Environmental Entomology*. 29:1041-7.
- Tzanakakis, M. E. 2006. Insects and mites feeding on olive: distribution, importance, habits, seasonal development and dormancy. *Applied Entomology Library Ser. No. 1*. Brill, Leiden, The Netherlands.
- Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, J., Tomoda, H., Omura, S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfunginins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. *J. Antibiotics*. 58: 804-809.
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential. Butt, T., Jackson C., Magan, N. (Ed.). CABI publishing. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn UK. 311-346 pp.
- Vidal-Quist, J., Castañeda, P., González-Cabrera, J., 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Citrus Orchards in Spain and Evaluation of Their Insecticidal Activity against *Ceratitis capitata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 749-759.
- Vincent, F., Wegst, G., 2004. "Design and mechanical properties of insect cuticle". *Arthropod Structure & Development*. 33: 187-199.
- Vontas, J., Hernandez-Crespo, P., Margaritopoulos, J., Ortego, F., Feng, H., Mathiopoulou, K., Hsu, J. 2011. Insecticide resistance in Tephritid flies.

- Pestivie Biochemistry and Physiology. 100: 199-205.
- Walter, O., Beys-Da, S., Santi, L., Berger, M., Calzolari, D., Passos, D., Guimaraes, J., Moresco, J., Yates, J. 2014. Secretoma of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* Reveals new insights into infection. Journal of proteome research. 13: 2282-2296.
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., Wang, Ch. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxinas in *Metarhizium* species. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America. 109: 1287-1292.
- Wang, C., Skrobek, A., Butt, TM. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal Invertebrate Pathology. 85: 168-174.
- Xiang, M., Jun, H., Feng, J., S, R. 2011. Inhibition of cellular proliferation and apoptosis in *Spodoptera litura* (Lepidoptra: Noctuidae) SL-1 cells induced by destruxin A and destruxin B. Acta entologica Sinica. 09.
- Yousef, M., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2014. One *Metarhizium brunneum* strain, two uses to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Journal Economic Entomology. 107: 1736-1744.
- Yousef, M., Lozano-Tovar, M.D., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. 2013. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. Journal of Economic Entomology: 106:1118-1125.
- Zenil, M., Liedo, P., Williams, T., Valle, J., Cancino, J., Montoya, P. 2004. Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). Biological Control 29: 169-178.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 17: 879-920.
- Zucchi, R.A. 2007. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. En: Hernández Ortiz, V. (Ed.). Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo. Distrito Federal, México: S y G Editores. 77-100 pp.

### 3. LOS MICROORGANISMOS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES

Las plantas en su entorno, están expuestas a organismos deletéreos tales como hongos, bacterias, virus y nematodos, que son responsables de enfermedades en las plantas, estos organismos afectan a la producción de alimentos en todo el mundo generando pérdidas importantes. En gran medida el control de las enfermedades en la producción de cultivos depende de insumos químicos, el uso indiscriminado de éstos ha provocado varios efectos negativos sobre el ambiente y la salud humana y animal. Una alternativa a esta problemática es el uso de microorganismos para el control de los fitopatógenos, los cuales son más amigables con el medio ambiente.

Un gran número de microorganismos, con énfasis en

hongos y bacterias, son considerados como benéficos por su capacidad de ser antagonistas de microorganismos fitopatógenos y mejorar la protección de las plantas frente a los mismos. El término antagonismo se refiere a un mecanismo generalizado mediante el cual la supervivencia o actividad causante de la enfermedad de un patógeno se reduce. En la última década se han incrementado las investigaciones de control biológico con microorganismos, pues éstos se ajustan a los principios de sostenibilidad agrícola que emanan de la normativa fitosanitaria europea: son menos agresivos contra el medio ambiente y la salud humana, tienden a ser más específicos, a menudo son eficaces en muy pequeñas cantidades y se descomponen rápidamente, lo que

resulta en exposiciones más bajas y se evitan en gran medida los problemas de contaminación. En programas de manejo integrado de plagas, la eficacia de los bioplaguicidas puede ser igual o mejor que la de los productos convencionales, especialmente para los cultivos como frutas, verduras, frutos secos y flores (Usta, 2013). Dentro de los biofungicidas son conocidos los obtenidos a partir de especies de *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Bacillus* y *Streptomyces*, entre otros. Dentro de los bioherbicidas se conocen algunos a base *Phytophthora palmivora* (Butler) y *Phomopsis amaranthicola* (Roskopf, Charudattan, Shabana & Benny) (Charudattan, 2005, Usta, 2013).

### **3.1. Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas**

En la naturaleza existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus

antagonistas, de forma que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos la enfermedad, no se desarrolle. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de éstos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. La antibiosis ocurre cuando un microorganismo produce moléculas que afectan negativamente a otros organismos por toxicidad o inhibición del crecimiento (Fig. 13). Dentro de este grupo se incluyen los productos metabólicos como antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras. Diversos autores han planteado que la capacidad de los microorganismos para suprimir el desarrollo de fitopatógenos depende en gran medida de la habilidad que tengan de producir

enzimas catalíticas y metabolitos de naturaleza antibiótica y fúngica (Berg et al., 2005, Anitha y Rabeeth, 2010). El parasitismo puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1, 3-glucanasas y proteasas, que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Hamid et al., 2013).

Varios microorganismos de biocontrol también tienen capacidad de colonizar y crecer en asociación con las raíces de las plantas. En la rizosfera los microorganismos antagonistas compiten eficazmente con los patógenos de las plantas por los nutrientes, los sitios de infección y el espacio. La competencia por la glucosa en el suelo es uno de los factores que está implicado en la supresión de enfermedades. Las

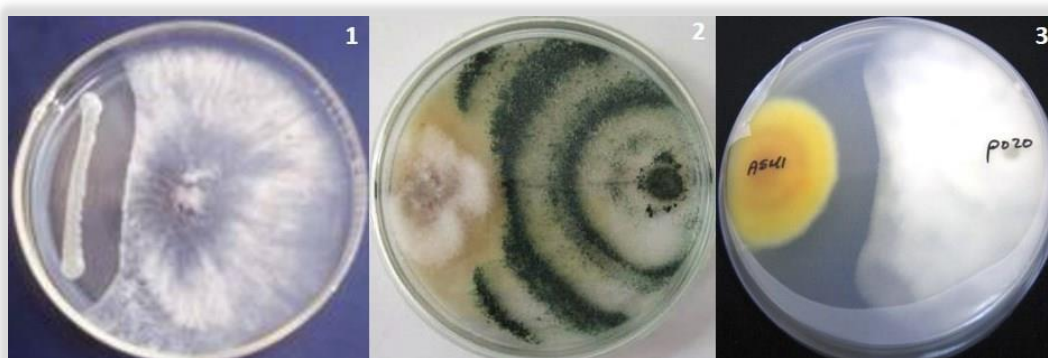
bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* (Migula) y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces, dada su capacidad colonizadora (Ahmad et al., 2008).

Otro mecanismo importante de los microorganismos de biocontrol es la capacidad de inducir cambios metabólicos en las plantas que aumentan su resistencia a una amplia gama de microorganismos patógenos (hongos y bacterias). La Resistencia Sistémica Inducida (ISR, por sus siglas en inglés), mejora la respuesta de las plantas al ataque de patógenos estimulando la producción de compuestos de defensa en las plantas. La ISR generalmente es de carácter sistémico, ya que la resistencia a enfermedades se produce en los sitios de distancia desde la ubicación de los microorganismos de biocontrol, la inducción de resistencia incluye la producción de

lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico entre otros (Pieterse et al. 2014).

Otra forma en la que estos organismos benéficos actúan, es a través de la promoción del crecimiento de las plantas mediante la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales y fijación del nitrógeno atmosférico entre otros. Hay varios ejemplos de biofungicidas que pueden mejorar la biomasa de raíces y la absorción de nutrientes como cobre, fósforo, hierro y manganeso lo que se refleja

en la producción de los cultivos (Palaniyandi, et al., 2013), tal es el caso de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) cuando es aplicado como agente de control biológico en semillas. Su efecto benéfico no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas (Cawoy et al., 2011).



**Figura 13.** Antibiosis de los microorganismos antagonistas. (1), *Bacillus* spp. (izquierda) frente a *Botrytis squamosa* JC.Walker (derecha). (2), *Trichoderma harzianum* (Rifai), (derecha) frente a *Fusarium* sp. (izquierda). (3), *Metarhizium brunneum* (izquierda) frente *Phytophthora megasperma* (derecha). (Ciampi, et al., 1994, Quiroga-Rojas, et al., 2010, Lozano-Tovar, et al., 2013).

### 3.2. Microorganismos más utilizados para el control de enfermedades en plantas

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos contra microorganismos patógenos de plantas. Los microorganismos más usados en control biológico pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces* etc. También se ha reportado el uso de levaduras y recientemente el uso de entomopatógenos para manejo de las enfermedades en plantas (Vega et al., 2009).

Desde hace varias décadas se viene documentando el uso de microorganismos antagónicos para el manejo de enfermedades. Estudios en rosas para el control del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.), usando levaduras como *Exophiala jeanselmei* (Langeron), obtenidas de pétalos de rosas, mostraron una disminución de la incidencia de la enfermedad en un 63% (Redmond et

al., 1987). *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner) y *Candida ciferrii* (Kreger-van Rij), aisladas de la superficie de manzanas sanas, también han demostrado que controlan la podredumbre azul causada por *Penicillium expansum* (Link), reduciendo la enfermedad en un 80.0% a 25°C (Vero et al., 2002). Igualmente se cita a la bacteria *Rahnella aquatilis*, inhibiendo la germinación de conidios de *P. expansum* y *B. cinerea* en manzana, por medio de la competencia por nutrientes (Calvo et al., 2007).

*Coniothyrium minitans* (W.A. Campb), es un micoparásito de los fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib. de Bary) y *Sclerotinia minor* (Jagger), dos formulaciones a base de este microorganismo son usadas para la destrucción de los esclerocios de estos dos patógenos (Whipps and Lumsden, 2001). Productos a base de *Gliocladium virens* (Corda), son aplicados como control de



*Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Pythium* spp. (Pringsheim), patógenos de hortalizas y ornamentales. *Ampelomyces quisqualis* (Cesati), (AQ10), es uno de los primeros bioformulados desarrollados específicamente para controlar el oidio, enfermedad producida por especies del género Erysiphaceae en fresa, tomate, árboles frutales y ornamentales (Angeli et al., 2012). La levadura *Candida oleophila* (Montrocher), es usada para reducir la pudrición causada por el moho gris (*Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.), y el moho azul (*Penicillium italicum* Wehmer) en cítricos. De igual manera esta levadura ha demostrado ser eficaz contra la pudrición ácida de las frutas y vegetales causada por *Geotrichum candidum* (Link) (Droby et al., 2009).

Las especies del género *Trichoderma*, son organismos cosmopolitas y se encuentran en todos los suelos especialmente en aquellos ricos en materia orgánica,

su actividad antagónica se ha evaluado sobre numerosas especies de patógenos de plantas como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia Sclerotiorun*, *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) etc, (Ezziyani et al., 2004). Las especies del género *Trichoderma* no solo protegen a las plantas al competir directamente con los hongos patógenos sino que establecen múltiples interacciones con las plantas con las cuáles se asocian. Entre las interacciones más importantes están la inducción de resistencia sistémica, la tolerancia al estrés abiótico y la promoción de crecimiento vegetal por la solubilización de nutrientes (Mukherjee et al., 2013).

Tjamos (2008), plantea el control biológico como una herramienta de gran potencial para el manejo de *V. dahliae* por lo cual es necesario la búsqueda, evaluación y explotación de hongos y bacterias antagonistas. Estudios con microorganismos obtenidos de

la rizosfera de olivos silvestres han mostrado que aislados del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus* tienen alta capacidad antagónica frente a *V. dahliae* (Aranda et al., 2011). Trabajos realizados con *Pseudomonas fluorescens* han demostrado la eficacia en la reducción de la incidencia y severidad (31.0-82.0% y 73.0-96.0%) de la Verticilosis tanto en plantones de olivo como en algodón, igualmente aislados de *Pseudomonas putida* (Trevisan) y *Bacillus* spp. redujeron el crecimiento micelial *in vitro* de *V. dahliae* (Mercado-Blanco et al., 2004, Mansoori et al., 2013).

Estudios realizados con *Gliocladium roseum* (Bainier) y *Talaromyces flavus* (Klöcker) han demostrado la reducción de la viabilidad de los microesclerocios de *V. dahliae* y la disminución de la Verticilosis en tomate, berenjena y patata (Madi et al., 1997); igualmente trabajos realizados con

cepas de *Streptomyces plicatus* (Arakawa y Muramatsu), han mostrado actividad contra aislados de *V. dahliae* (Alghighi et al., 2004, Sadeghy y Hatamy, 2013).

Para el control de *V. dahliae* también se han evaluado enmiendas orgánicas basadas en aguas residuales procedentes del beneficio del aceite de oliva enriquecidas con los microorganismos como *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukomoto) logrando reducciones importantes en la densidad de microesclerocios de *V. dahliae* (Vitullo et al., 2013).

En cuanto al control biológico contra *Phytophthora* spp., hay referencias en las cuáles cepas de *Streptomyces* han sido eficientes en la disminución de la severidad de *P. megasperma* en alfalfa y soja (Xiao et al., 2002), también se han citado a las especies de *T. harzianum*, *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz, *Trichoderma polysporum* (Link: Persoon) Rifai, *Trichoderma viride* (Pers.), *Gliocladium roseum*, y

*Bacillus subtilis*, como antagonistas de varias especies de *Phytophthora* (González Benavente et al., 2002).

Actualmente hay un marcado interés en el estudio de los microorganismos endófitos debido a que expresan una serie de funciones relacionadas con la protección de las plantas a factores bióticos y abióticos (Zabalgogeoazcoa, 2008). Estudios sobre microorganismos endófitos indican que algunos de ellos pueden invadir todas las estructuras de las plantas, mientras que otros establecen relaciones específicas con órganos de la planta como raíces, hojas, flores etc. La colonización endófitica puede ser intracelular o intercelular o puede darse simultáneamente ambas condiciones. La transmisión horizontal parece ser el mecanismo predominante de la dispersión entre las especies endofíticas. Sin embargo estudios de Gallery et al., (2007), indican que también es posible la transmisión de endófitos a

través de las semillas. Investigaciones realizadas por Quesada et al., (2014), demostraron la transmisión vertical de una cepa de *B. bassiana* con capacidad endofítica en plantas de opio, el hongo fue detectado en el 50% de las cápsulas muestreadas de la primera generación y en el 25% de las cápsulas de la segunda generación de plantas. Además las investigaciones llevadas a cabo con endófitos indican que algunos de los mecanismos de biocontrol están relacionados con la producción de compuestos antimicrobianos y la inducción de resistencia (Zabalgogeoazcoa, 2008). Se han aislado compuestos activos de más de 6500 hongos endófitos, estas sustancias se originan por diferentes vías biosintéticas y pertenecen a diversos grupos estructurales como alcaloides, terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenoles, isocumarinas, benzopiranonas, tetralonas,

citocalasinas, flavonoides y enniatinas (Schulz et al., 2002). Asociada a la diversidad estructural de los metabolitos secundarios biosintetizados por los hongos endófitos, sobreviene su pluralidad funcional y su aplicación. También se ha documentado la capacidad que tienen los hongos endófitos de producir sustancias de crecimiento vegetal (hormonas) que favorecen el incremento de biomasa en las plantas (Rodríguez et al., 2009).

### **3.3. Importancia de las enzimas y los metabolitos secundarios de origen microbiano para el control de fitopatógenos**

Las enzimas líticas extracelulares producidas por los antagonistas son fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista. Las enzimas quitinolíticas tienen aplicaciones de

amplio alcance, para el control de hongos patógenos. Las quitinasas son glicosil-hidrolasas con tamaños que van desde 20 kDa a 90 kDa aproximadamente, muestran diferencias en estructura molecular, especificidad de sustratos y en los mecanismos catalíticos. Las quitinasas son activas en un amplio rango de pH que van desde 4.5 a 10 y de temperaturas entre los 28°C y 80°C, dependiendo de la especie de donde hayan sido aisladas (Hamid et al., 2013).

Varios estudios han demostrado que la efectividad de *Serratia marcescens* (Bizio), como agente de biocontrol contra *Sclerotium rolfsii* está relacionada con la producción y actividad sinérgica de las quitinasas Chi A, Chi B, and Chi C1. Se ha demostrado que la producción de quitinasas por el micoparásito *Talaromyces flavus* inactiva la germinación de esporas y la

elongación del tubo germinativo en *V. dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* (Duo-Chuan, et al., 2005, Hamid et al., 2013). En cepas de *T. harzianum* se han determinado sistemas quitinolíticos compuestos por 5 a 7 enzimas ( $\beta$ -(1,4)-N acetilglucosaminasas, endoquitinasas y exoquitinasas), que actúan sinérgicamente en los procesos hidrolíticos (Hasan et al., 2014). La producción extracelular de proteasas en especies de *Trichoderma* tiene un papel importante en la lisis de las paredes de los fitopatógenos y en los mecanismos de biocontrol, están involucradas también en vencer los mecanismos de defensa del huésped e inactivan las enzimas hidrolíticas del patógeno incapacitándolo para que penetre en los tejidos de las plantas, lo que se traduce en una reducción de los síntomas de las enfermedades en las plantas (Hasan et al., 2014).

Varias especies de actinomicetos particularmente pertenecientes al género *Streptomyces* tienen actividad antagónica frente a fitopatógenos por la producción de enzimas hidrolíticas como las quitinasas y las  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1-4-glucanasas, las cuales han sido evaluadas para el control de especies de *Colletotrichum spp.* y *Alternaria spp* con éxito (Srividya, et al., 2012). Las glucanasas degradan los  $\beta$ -1,3 glucanos, principales componentes de la pared celular de los hongos, ya que se producen aberturas por las cuales los hongos obtienen nutrientes; se han reportado múltiples glucanasas en hongos tales como *Acremonium sp* y en *Trichoderma harzianum* (Almeida et al., 2007).

Hay una amplia documentación de la producción de sideróforos (estructuras que forman quelatos de hierro) como mecanismo de biocontrol. El hierro juega un papel fundamental en el

metabolismo de los seres vivos, ya que gracias a su potencial redox, forma parte de los centros activos de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. El hecho de que estas enzimas sean imprescindibles para la vida convierte al hierro en un elemento esencial para prácticamente todos los organismos. A pesar de la relativa abundancia de hierro en la corteza terrestre, su disponibilidad para ser absorbido por microorganismos es baja debido a la poca solubilidad de los compuestos con  $Fe^{+3}$ . Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, que algunos microorganismos sintetizan y liberan al medio. Una vez allí se unen específicamente al hierro, ya que tienen la capacidad de actuar como agentes quelantes, dando lugar a la formación de complejos metálicos denominados ferrosideróforos. Una vez formado, el complejo es absorbido por los microorganismos productores,

aunque también puede ser utilizado por otros microorganismos filogenéticamente relacionados y en algunos casos no relacionados pero sí pertenecientes al mismo hábitat. Una vez en su interior el hierro será liberado enzimáticamente o por reducción a  $Fe^{+2}$  pudiendo pasar a formar parte del centro activo de proteínas de interés biológico (Ahmed y Holmström, 2014). Esta habilidad de los microorganismos antagonicos de secuestrar iones de hierros y no dejarlos disponibles para los fitopatógenos es considerada un mecanismo importante de biocontrol. En especies del género *Trichoderma* se ha determinado el efecto sinérgico de la producción de sideróforos y de enzimas líticas (celulasas, xilasas, quitinasas, glucanasas proteasas,  $\beta$ -1,3 glucanases) en el control de hongos fitopatógenos (Hasan et al., 2014).

Otro aspecto importante en el control biológico es la producción de

metabolitos secundarios. La bioprospección de metabolitos secundarios de origen microbiano ha permitido identificar nuevas moléculas biológicamente activas. Esta práctica se ha realizado desde el siglo XVIII, mediante la exploración de extractos de fermentaciones microbianas con actividad antibiótica (Higgs et al., 2001). Actualmente se convierten en una fuente importante de nuevos compuestos fungicidas y bactericidas (Vey et al., 2001, Sarabia et al., 2004) en la cual es necesario profundizar el conocimiento. La búsqueda de metabolitos provenientes de los microorganismos, representa un campo en rápido crecimiento.

Estos compuestos no están directamente relacionados con el crecimiento o reproducción del microorganismo pero juegan un papel importante en la tolerancia a condiciones ambientales y en la interacción con otros organismos

(microorganismos y sistemas no microbianos como plantas, animales etc.). Se conocen alrededor de 50.000 compuestos originados por el metabolismo secundario de microorganismos, lo que indica una alta diversidad en estructuras químicas y funciones biológicas. Muchos compuestos tienen efectos biofísicos como biosurfactantes, biofloculantes, quelatantes y fotoprotectores. Los metabolitos secundarios secretados por los hongos incluyen policétidos, depsipéptidos, péptidos no ribosomales, terpenoides e indol alcaloides. Estos compuestos exhiben un amplio rango de actividades biológicas como actitumorales, citotóxicas, inmonosupresoras, antiproliferativas, antiinflamatorias, antibióticas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y fitotóxicas (Pedras et al., 2002, Ballard et al., 2002, Sarabia et al., 2004, Peng et al., 2005, Uchida et al., 2005, Liu

and Tzeng, 2012, Lee et al., 2012, Chun-chi et al., 2013).

Especies de los géneros fúngicos *Trichoderma* y *Gliocladium* producen una serie de metabolitos secundarios como los peptaiboles, polikétidos, terpenos, pironas. La especie *T. viride* (Pers.), produce una gliotoxina que actúa contra *Pythium ultimum* (Trow) y además produce auxinas que facilitan la colonización de la planta hospedante y mejoran el crecimiento de las raíces (Contreras-Cornejo et al., 2009).

Los peptaiboles son polipéptidos compuestos de 15 a 20 residuos de aminoácidos, en alta proporción los aminoácidos son residuos de isovalina, hidroxiprolina, etilnorvalina y ácido isobutírico, tienen actividad antimicrobiana contra los hongos y las bacterias Gram-positivas, dentro de este grupo son conocidos las trichokindinas, las trichorzinas y las harzianinas (Schuhmacher et al., 2007, Panizel et al., 2013), algunas

de las cuales han sido determinadas en *T. harzianum*. Muchos de estos compuestos son utilizados por los microorganismos en forma sinérgica con las enzimas de degradación de la pared celular para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos (Panizel et al., 2013). Estudios de Benítez et al. (2004), indican que la germinación de esporas de *Botrytis* sp fue inhibida al ser tratadas con una mezcla de quitinasas y gliotoxina, la  $\beta$ -1,3 glucanasas degradó la pared celular, mientras que la gliotoxina inactivó la  $\beta$ -1,3-glucano sintetasa del patógeno. Tricholin es otro compuesto que ha sido aislado del caldo de cultivo de *T. viride*, tiene actividad fungicida inactivando los ribosomas, lo cual provoca un cese en el crecimiento y en la biosíntesis de las proteínas, siendo efectivo en el control de *Rhizotonia solani* (J .G. Kühn) (Lin et al., 1994).



Caso especial revisten los hongos endófitos que producen una serie de metabolitos antimicrobianos que previenen daños por fitopatógenos en la planta hospedante, lo cual resulta en un mejoramiento de la resistencia de la planta a los patógenos (Rodríguez et al., 2009, Ownley et al., 2010). Zhao et al. (2012), aislaron dos compuestos del endófito *Gliomastix murorum* (Corda) S. Hughes, con actividad antimicrobiana un esteroide y un benzofurano, ambos compuestos inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* (Migula), *Pseudomonas lachrymans* (patógenos de la mancha angular de las curcurbitáceas) Earle, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus haemolyticus* (Schleifer & Kloos). Dos antibióticos pyrrocidinas A y B han sido aislados del endófito del maíz (*Zea mays* L.), *Acremonium zeae* (W. Gam & D.R.Sumner), con demostrada actividad contra los patógenos *Aspergillus flavus* (Link) y

*Fusarium Verticillioides* (Link). Igualmente del endófito *Chaetomium globosum* (Kunze ex Fr.), se han aislado compuestos alifáticos y alcaloides activos contra *Mucor miehei* (Cooney & R. Emers.) (Yu et al., 2010). Los compuestos chaetoglobosin A y chaetoglobosin C, aislados también de *Ch. globosum* fueron eficaces *in vitro* e *in vivo* contra *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard, patógeno del maíz (Zhang et al., 2013).

*Edenia gomezpompae* (vetenskapligt namn), un endófito de las hojas de *Callicarpa acuminata* (Kunth) (Verbenaceae), produce varios compuestos con potencial antifúngico, incluyendo las preusomerinas EG1, EG2 y EG3 y las palmarumicinas CP2, CP17 y CP18. Las preusomerinas inhiben significativamente el crecimiento de diversos microorganismos fitopatógenos de importancia económica, como *Fusarium oxysporum* (Schlecht), *Rhizoctonia*

sp, *Alternaria solani* (Sorauer), *Phytophthora capsici* (Leonian) y *Phytophthora parasitica* (Macias-Rubalcava et. al., 2008).

### **3.4. Los hongos entomopatógenos y sus metabolitos en el control de microorganismos fitopatógenos**

En este contexto, recientes estudios plantean los múltiples roles de los hongos entomopatógenos como agentes antagonistas de fitopatógenos y microorganismos promotores de crecimiento vegetal (Vega, 2008; 2009, Ownley et al., 2008, Bruck, 2010, Quesada-Moraga et al., 2014). Varios mecanismos de antagonismo se han identificado en los hongos entomopatógenos. Estos incluyen la producción de diversos metabolitos, como antibióticos, compuestos bioactivos volátiles (por ejemplo, amoníaco, cianuro de hidrógeno, pironas de alquilo, alcoholes, ácidos, ésteres, cetonas y lípidos) y enzimas. Otros mecanismos son la competencia (por nicho o sitio de

infección, carbono, nitrógeno u otros minerales), el parasitismo, hipovirulencia, la resistencia sistémica inducida y aumento de la respuesta del crecimiento de las plantas (Pal, McSpadden Gardener, 2006, Shahid et al., 2012). Igualmente los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de producir enzimas quitinolíticas proteasas, quitinasas, glucanasas y lipasas (Shubakov y Kucheryavykh, 2004). Esa capacidad que tienen los hongos para inducir la expresión de las enzimas con diferentes sustratos o moléculas abre la posibilidad para utilizarse en el control de enfermedades en plantas ocasionadas por hongos (Franco-Chavez et al. 2011).

El entomopatógeno *Tolypocladium Cylindrosporium* (W. Gams, *Persoonia*) produce la proteína subtilisina que tiene propiedades antibióticas y previene el crecimiento de bacterias como las

*Pseudomonas* (Popova, et al., 2015). También, es bien conocido el entomopatógeno *Verticillium lecanii* (R. Zare & W. Gams) como agente de bicontrol de fitopatógenos ya que produce quitinasas que son activas a 40°C y a pH 4.6, las cuales inhiben la germinación de esporas de varios fitopatógenos (Yu et al., 2015).

Se ha descrito el efecto aditivo e incluso sinérgico de los AME *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosorosea* con los micoparásitos *Clonostachys* spp, y *Trichoderma harzianum* (Krauss et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, es conocido el potencial de los hongos endofíticos como una nueva fuente de moléculas biocidas de origen natural bien bactericidas, nematocidas, fungicidas, además pueden producir fitohormonas y otras sustancias de crecimiento vegetal (Schulz et al., 2002, Schulz y Boyle, 2005). En este sentido, tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae* han sido descritos como endófitos

naturales de plantas herbáceas y leñosas produciendo sustancias insecticidas, fungicidas y bactericidas (Quesada-Moraga et al., 2006; 2009, Vega et al., 2008).

Varios autores han demostrado la producción de sustancias antimicrobianas por los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) y *Paecilomyces lilacinus* (Thom), con un rango de acción sobre hongos y bacterias (Molnár et al., 2010). Krasnoff y Gupta (1994), aislaron e identificaron un compuesto de bajo peso molecular en *H. trompsonii*, llamado phomalactona, con actividad fungicida *in vitro*. Sanivada y Challa (2014), evaluaron aislados de *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* (Bals.-Criv.) Vuill, *M. anisopliae*, *Metarhizium globosum* (J.F.Bisch., Rehner y Humber), *M. guizhouense* (Q. T. Chen & H. L. Guo) y *Numurea rileyi* (Farlow) Samson, los cuales mostraron

actividad antifúngica frente a *Colletotrichum falcatum*.

En cuanto a *Metarhizium*, las investigaciones han demostrado la capacidad de este hongo para colonizar los tejidos internos y su potencial como promotor de crecimiento de las plantas. Sasan y Bidochka (2012), demostraron que aislamientos de *Metarhizium robertsii* colonizaron endofíticamente a *Panicum virgatum* L. y *Phaseolus vulgaris* L. Las raíces de las plantas tratadas con *M. robertsii* crecieron más rápido y la densidad de los pelos radicales de la planta aumentó en comparación con las plantas no inoculadas. Resultados similares fueron obtenidos por Kabaluk y Ericsson (2007) en *Zea mays*, cuando las semillas fueron tratadas con *M. anisopliae*, la biomasa, peso fresco del área foliar, y el rendimiento aumentaron significativamente. Igualmente, Sasan y Bidochka (2013), demostraron también

actividad fungicida de *Metarhizium robertsii*, cuando plantas de frijol fueron colonizadas por *M. robertsii* y expuestas luego a *Fusarium solani*, las plantas colonizadas por *M. robertsii* fueron más sanas y los niveles de enfermedad fueron menores comparados con las plantas no colonizadas por *M. robertsii*.

De la misma manera aislados de *M. anisopliae* evaluados contra *Ceratocystis ulmi* (Buisman), *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* mostraron antagonismo (Gemma et al., 1984 Kang et al., 1996). Por otro lado, Yong-Xia et al. (2010), demostraron la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, el patógeno de la marchitez del algodón, cuando fue evaluado frente a *M. anisopliae*. Extractos orgánicos de *M. anisopliae* obtenidos con diclorometano mostraron actividad fungicida frente a *Fusarium oxysporum*,

*Cladosporium herbarum* (Pers.) y *Curvularia clavata* (Boedijn) (Ravindran et al., 2014)

Respecto a los mecanismos de antagonismo utilizados por *B. bassiana* se incluyen antibiosis, competencia por nutrientes e inducción de resistencia sistémica (Ownley et al., 2008, Shahid et al., 2012). Trabajos realizados en tomate (*Solanum lycopersicum* Miller), mostraron que cuando las plantas fueron colonizadas endófitamente por *B. bassiana*, éstas fueron resistentes a la invasión de *Rhizoctonia solani* (Ownley et al., 2004). Estudios *in vitro* han mostrado que *B. bassiana* inhibe el crecimiento micelial de patógenos de plantas tanto radicales como foliares en los que se encuentran *Gaeumannomyces graminis* (patógeno de cereales) Sacc., *Armillaria mellea* (Vahl), *Rosellinia Necatrix* var. *Tritici* (Prill), y *Fusarium oxysporum* (Ownley et al., 2008). Extractos orgánicos de *B.*

*bassiana* obtenidos con etilacetato mostraron actividad antagónica contra *Alternaria tenuis* (Keissi), *Fusarium avenaceum*, *F. graminearum* (Sacc.), *Aspergillus parasiticus* (Speare), *F. moniliforme* (Shel.) y *F. oxysporum* (Sahab, 2012).

La Beauvericina producida por especies de *Beauveria* tiene actividad antibiótica contra varias bacterias entre las cuales están *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei* (Lehmann & Neumann), *Sarcinea lutea* (Goodsir), *Staphylococcus aureus* (Rosenbach) y *Enterococcus faecalis* (Schleifer & Kilpper-Bälz) (Vey et al., 2001). La oosporeina, es considerada un antibiótico con actividad contra bacterias gram positivas, algunos reportes muestran que puede llegar a tener actividad fitotóxica y efecto negativo sobre células de mamíferos, sin embargo, los resultados son aún contradictorios (Strasser et al., 2000, Vey et al., 2001).

Los trabajos de Lozano-Tovar et al. (2013), demuestran el efecto negativo de extractos y fracciones orgánicas obtenidos de *Metarhizium* y *Beauveria* sobre *V. dahliae*, *P.*

*megasperma* e *inundata*, patógenos del olivo, con disminución del crecimiento micelial entre un 73.6 y 100% e inhibición de la germinación de propágulos entre un 38.6 y 100%.

### 3.4. Referencias bibliográficas

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Reserch.* 163: 173-181.
- Almeida, D., Bruno, F., Menezes, F., Do Nascimento, R., Ulhoa, C., Lopes, A. 2007. "Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters* 8: 1189-1193.
- Alghighi, S. Shahidi, B., Saadoun, I. 2004. First report of antifungal properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (Strain101) against four Iranian Phytopathogenic Isolates of *V. dahliae* a new horizon in biocontrol agents. *Biotechnology* 3: 90-97.
- Angeli, D., Poupolo, G., Maurhofer, M., Gessler, C., Pertot, I. 2012. Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production? *Biological Congrol.* 63: 348-358.
- Aranda, S., Montes- Borrego, M. Jiménez - Díaz, R., Landa, B. 2011. Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *Europaea* Var. *Sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil* 343: 329-345
- Anitha, A., Rabeeth, M. 2010. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. *African Journal of Plant Science.* 4: 61-66.
- Ahmed, E., Holmström, S. 2014. The effect of soil horizon and mineral type on the distribution of siderophores in soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 131: 184-195.
- Ballard, C., Yu H, Wang, B. 2002. Recent development in depsipeptide. *Curr. Med. Chem.* 9, 471
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., Hallmann, J. 2005. Endophytic and ectophytic potatoassociated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51:215-229
- Bruck, D. 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *Biocontrol.* 55:103-112
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M., Benuzzi, D., Sanz de Tosetti, M. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology.* 113: 251-257.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. 2011. Bacillus-based biological control of plant diseases. Pesticides in the modern world—pesticides use and management. InTech, Rijeka, 273-302 pp
- Charudttan, R., 2005. Use of plant pathogens as bioherbicides to manage weeds in horticultural crops. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118:208-214.
- Chun-Chi, W., Tzu-Hsiu, Ch., Bing-Lan, L., Li-Chen, W., Yung-Ching, Ch., Yew-Min, T., Shih-Lan, H. 2013. Destruxin B

- Isolated from Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Induces Apoptosis via a Bcl-2 Family-Dependent Mitochondrial Pathway in Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Article ID 548929, doi:10.1155/2013/548929.
- Contreras-Cornejo, HA., Macias-Rodríguez, L., Cortes-Penagos, C., Lopez-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 149:1579–92
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52:137-145
- Duo-Chuan, L., Chen, S., Jing, L. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia*: 159: 223-9.
- Ezziyani, M., Requena, M., Candela, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento *Capsicum annum*. *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Franco-Chávez, K., Rodríguez, S., Cervantes, J., Barranco, J., 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades rurales producción y medio ambiente*.
- Gemma, J., Hartmann, G., Wasti, S. 1984. Inhibitory interactions between *Ceratocystis ulmi* and several species of entomopathogenous fungi. *Mycologia* 76: 256-260
- González-Benavente, A., Fernández-González, J., Rodríguez, R., Beltran, C., Lacasa, A. López J. 2002. Control biológico in vitro de *Phytophthora capsici* mediante cepas de PGPR. *Phytoma* 143: 24-33.
- Hamid, R., Khan, M., Ahmad, M., Ahmad, M., Abdin, M., Musarrat, J., Haved, S. 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*. 5: 21-29.
- Hasan, S., Gupta, G., Anand, S., Kaur, H., 2014. Lytic enzymes of *Trichoderma*: their role in plant defense. *International Journal of Applied Research and Studies*. 3: 1-5.
- Higgs, R.E., Zahn, J.A., Gygi, J.D., Hilton, M.D. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 371-376.
- Kabaluk, J., Ericsson, J. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal* 99: 1377-1381.
- Kang, C.S., Goo, B.Y., Gyu, L.D., Heon, K.Y. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alteraria solani*. *Korean Journal of Mycology* 24: 49-55.
- Krasnoff, S., Gupta, S. 1994. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* Var. *Synnematosa*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 293-302.
- Lee, Y., Wang, C., Liao, W., 2012. In vitro and in vivo anticancer effects of destruxin B on



- human colorectal cancer Anticancer Research. 32: 2735–2745 Lee et al., 2012,
- Lin, A., Lee, TM., Rern, JC. 1994. Tricholin, a new antifungal agent from *Trichoderma viride*, and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. Journal Antibiotic 47: 799-805
- Liu, B., Tzeng, Y. 2012. Development and applications of destruxins: A review. Biotechnology Advances 30: 1242-1254.
- Lozano-Tovar, M.D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas, A., Quesada-Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. Biological Control 67:409-420
- Macías-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B., Jiménez-Estrada, M., González, M., Glenn, A., Hanlin, R., Hernández-Ortega S., Saucedo-García, A., Murcia-González, J., Anaya A. 2008. Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. Phytochemistry. 69: 1185-1196.
- Madi, L., Katan, T., Katan, J., Henis, Y., 1997. Biological control of *Scerotium rolfii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediate by different mechanisms. Phytopatology. 87: 1057-1960.
- Mansoori, M., Heydari, A., Hassanzadeh, N., Rezaee, S., Naraghi, L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* Bacterial Antagonists for Biological Control of Cotton *Verticillium* Wilt Disease. Journal of Plant Protection Research 53: 154-157.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervas, A., Jiménez-Díaz. 2004. Suppression of *Verticillium* Wild in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. Biological Control 30: 474-486.
- Molnár, I., Gibson, D., Krasnoff, S. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Natural product Reports 27: 1241-1275. Krauss, U., Hidalgo, E., Arroyo C., Piper S. 2004. Interaction between the entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. Biocontrol Science. Technology. 14: 331-346.
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Herrera-Estrella A., Schmoll, M., Kenerley, Ch. 2013. *Thichoderma* research in the genome era. Annu. Rev. Phytopathol. 51: 105-129.
- Ownley, B. Griffin, M., Klingeman, M., Gwinn, W. Moulton, K., Pereira, R. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology 98: 267-270.
- Ownley, B., Pereira, R., Klingeman, W., Quigley, N., Lecide, B. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pest and plant pathogens. In: Lartey, R.T., Caesar, A.J. (Eds). Emerging Concepts in Plant Health Management. Res. Signpost, Kerala, India. pp 255-269
- Ownley, B., Gwinn, K., Vega, F. 2010. Endophytic fungal

- entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55: 113-128.
- Pal, k., Gardener, McSpadden. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. APSnet. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-117-02.
- Palaniyandi, SA., Yang, SH., Zhang, L., Suh, JW. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied microbiology Biotechnology*. 97: 9621-36.
- Panizel, I., Yarden, O., Ilan, M., Carmeli, S. 2013. Eight new peptaibols from sponge-associated *Trichoderma atroviride*. *Marine drugs*. 11: 4937-4960.
- Pedras, M., Zaharia, LI., Ward, D. 2002. The destruxins: synthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59:579-796.
- Peng, K., Huang, H., Tzeng, Y., Liu, S. 2005. Circular dichroism analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae*. *J. Biochem.Biophys. Methods* 62: 41-50.
- Pieterse, C., Zamioudis, Ch., Berendsen, R., Weller, D., Van, S., Bakker, P. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 52: 347-375.
- Popova, W., Dunaevsky, YE., Domash, VI., Semenova, TA., Beliakova, GA., Belozersky, MA. 2015. Some properties and possible biological role of peptidase inhibitors from the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum*. *Archives of Microbiology*. 1-10
- Quesada-Moraga, E., Muñoz, F., Santiago, C. 2009. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental Entomology*. 38: 723-730.
- Quesada-Moraga, E., Landa, B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R., Santiago-Álvarez. 2006. Endophytic colonisation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia* 161: 323-329.
- Quesada-Moraga, E., Lopez-Diaz, C., Landa, B. 2014. The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: First demonstration of vertical plant transmission. *Plos one* 9:1-6
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., Sivaramakrishnan, S. 2014. Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against phytopathogenic fungi. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. 251-255 pp.
- Redmond, J.C., Marois, J.J., MacDonald, J.D. 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganism. *Plant Disease* 71:799-802.
- Rodríguez, RJ., White, JF., Arnold, AE., Redman, RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* 182:314-330.
- Sadeghy B., Hatamy, N. 2013. Several physiological features of *Streptomyces* sp. Isolate C-1 showing bioactivity against *Fusarium sambucinum* and *Verticillium dahliae*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 46: 2519-2527.
- Sahab, A.F., 2012. Antimicrobial efficacy of secondary

- metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Sciences Research*. 8: 1441-1444.
- Sanivada, S., Challa, M. 2014. Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. *JBiopest* 7: 33-37.
- Sarabia, F., Chamma, S., Sánchez, A., Martín, L., López, F, 2004. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 1309-332
- Sasan, R., Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*. 99: 101-107.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*. *Canadian Journal of plant pathology* 35: 288-293.
- Schuhmacher, R.; Stoppacher, N.; Zeilinger, S. 2007. Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: Screening, Identification, and Structure Elucidation by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In *Communicating Current Research and Education Topics and Trends in Applied Microbiology*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex: Badajoz, Spain 609-617 pp
- Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycology Research*. 109: 661-686.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A., Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004
- Shahid, A., Rao, A., Bakhsh, A., Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archi. Biology Science Belgrade* 64: 21-42.
- Shubakov, A. y Kucheryavykh, S., 2004, "Chitinolytic activity of filamentous fungi". *Appl. Biochem. Microbiol.* 40: 445-447.
- Sowjanya, K., Varma, A., 2015. An Introduction to entomopathogenic microorganisms. In: *Biocontrol of lepidopteran pest: use of soil microbes and their metabolites*. Edited by Sowjanya-Sree, K., Varma, A. Uttar Pradesh India. 1-10 pp.
- Srividya, S., Thapa, A., Blat, D., Golmei, K., Dey N. 2012. *Streptomyces* sp 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *European Journal Experimental Biology*. 2: 163-173.
- Strasser, H., Vey, A. Butt, T.M. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10, 717-735.
- Tjamos, E.C. 2008. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive1 *EPPO Bulletin*. 23: 505-512.
- Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, J., Tomoda, H., Omura, S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfunginins A and B, produced by *Metarhizium* sp.

- FKI-1079. J. Antibiotics. 58: 804-809.
- Usta, C. 2013. Microorganisms in biological pest control. A Review (bacterial toxin application and effect of environmental factor. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>).
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vega, F., Posada, F., Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* 46, 72-82..
- Vero, S., Mondino, P., Burguen, J., Soubes, M., Wisniewski, M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology* 26: 91-98
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. Butt, T., Jackson C., Magan, N. (Ed.). CABI publishing. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn UK. 311-346 pp.
- Vitullo, D., Altieri, R., Esposito, A., Nigro, F., Ferrara, M., Alfano, G., Lima, G. 2013. Suppressive biomasses and antagonist bacteria for an eco-compatible control of *Verticillium dahliae* on nursery-grown olive plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 10: 209-220.
- Whipps, J.M., Lumsden, R.D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agent: Status and Prospects. In: *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (eds). CABI publishing 9-23 pp.
- Xiao, K., Kindel, L., Saman, D. 2002. Biological control of Phytophthora Root Rots on alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control* 23: 285-295.
- Yong-Xia, QI., Fang-Xin, Ch., Zeng-Zhi, LI. 2010. Inhibitory mechanisms of *Metarhizium anisopliae* against the pathogens of Fusarium wilt of cotton. *Cotton Science* 22: 591-596.
- Yu, G., Xie, LQ., Li, JT., Sun, XH., Zhang, H., Du, Q., Li, QY., Zhang, SH., Pan, HY. 2015. Isolation, partial characterization, and cloning of an extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Genetics Molecular Research*. 14: 2275-89.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, Ch., Guo, L., Lim, W., Sun, P., Qin, L. 2010. Recent development and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 165: 437-449.
- Zabalgogezcoa, I. 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-246.
- Zhang, G., Wang, F., Qin, J., Wang, D., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang S., Pan H. 2013. Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum* No. 05, a new biocontrol agent, agent against *Setosphaeria turcica*. *Biological Control*. 64: 90-98.
- Zhao, J., Sun, W., Shan, T., Mou, Y., Lou, J., Li, Y., Wang, M., Zhou L. 2012. Antimicrobial metabolites from the

endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris*

*Poluphylla* var. *ynnanensis*.  
Journal of Medicinal Plants Research 6: 2100-2104.



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## 1. JUSTIFICACIÓN

En estudios muy recientes, se ha constatado que la función ecológica de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos puede traspasar la propia del control de insectos, con referencia a su función como promotores del crecimiento vegetal, capacidad endofítica e incluso su rol como agentes antagonistas de microorganismos fitopatógenos (Vega, 2008, 2009, Ownley et al., 2008, Bruck, 2010, Quesada-Moraga et al., 2014). Este último aspecto puede ser debido a mecanismos como antibiosis, competición e incluso inducción de resistencia sistémica (Ownley et al., 2008, Ownley et al., 2010).

Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) son un componente importante de la microbiota del suelo y muy importante en suelos de olivar (Quesada-Moraga et al., 2007),

aunque su presencia también es notable en el filoplano del olivo (Quesada-Moraga, Santiago-Álvarez, 2008). La hipótesis fundamental de este trabajo fue: (1) ¿pueden los tratamientos de suelo con AME en la base del árbol para el control de estados pre-imaginales tener un efecto contra hongos de suelo patógenos de olivo?, que de ser así supondría una aplicación novedosa dentro del escenario del Control Integrado de Plagas y Enfermedades en el Olivar (2) ¿pueden los extractos fúngicos de estas cepas estar implicados en esta actividad?, (3) ¿pueden estos extractos y/o moléculas producidas por estos organismos ser utilizados para el control de adultos de tefrítidos y los principales fitopatógenos del olivo?. Para dar respuesta a estas preguntas se seleccionó a *C. capitata* como modelo de tefrítido, así como *V. dahliae*, *P. megasperma* y *P. inundata*, como hongos del suelo patógenos de olivo de gran

importancia económica y se desarrollaron los siguientes objetivos.



## 2. OBJETIVOS

2.1. Evaluar y seleccionar aislados de *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp procedentes del suelo, filoplano y plantas arvenses de olivar mediante aplicación al suelo frente a estados preimaginales de *Ceratitis capitata* como modelo para el manejo de *Bactrocera oleae*.

2.2. Determinar la actividad antifúngica los HE *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp seleccionados contra los hongos fitopatógenos radiculares *Verticillium dahliae* y *Phytophthora* spp mediante estudios de inhibición en placa con cultivos duales y evaluación de sus extractos y dializados.

2.3. Determinar el potencial insecticida de las moléculas secretadas por los HE

*Beauveria* spp y *Metarhizium* spp seleccionados, frente adultos de tefrítidos.

2.4. Determinar y evaluar las fracciones orgánicas con actividad antifúngica de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre aislados de *Verticillium dahliae* y *Phytophthora* spp y su efecto sobre el progreso de la Verticilosis en plantas bajo condiciones controladas.

El primero y segundo objetivo fueron abordados mediante el desarrollo del trabajo titulado “ Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive”, el cual permitió seleccionar aislados con potencial insecticida para el control de estados pre-imaginales de *C. capitata* y evidenciar la actividad antifúngica de los extractos y dializados obtenidos de dos aislados de hongos entomopatógenos (EAMa 01/58 Su de *M. brunneum* y EABb

09/16 Su de *B. bassiana*) contra *V. dahliae* y *P. megasperma* e *inundata*

El estudio denominado “Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)”, contribuyó al cumplimiento del tercer objetivo, y se logró demostrar la alta capacidad de uno de los aislados (*M. brunneum* EAMb 09/01-Su), en secretar moléculas con actividad insecticida como las destruxinas, las cuales fueron probadas sobre adultos de *C. capitata*. Además otros trabajos abordados por el grupo de investigación de entomología PAIDI AGR 163 ratificaron la actividad insecticida de este aislado sobre especies como *B. olea* y *Spodoptera litoralis*, con excelentes resultados.

El cuarto objetivo fue abordado mediante el trabajo titulado “*Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungi release secondary metabolites with

antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens”, con el cual se determinó el efecto de las fracciones orgánicas obtenidas de hongos entomopatógenos en la inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma* *in vitro* y la reducción de la Verticilosis en plantas bajo condiciones controladas; además del efecto negativo de los extractos y fracciones parcialmente puras sobre la germinación y producción de microesclerocios de *V. dahliae* y propágulos de *Phytophthora* spp.



### III. INVESTIGACIONES REALIZADAS.

## **1. ASSESSMENT OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND THEIR EXTRACTS AGAINST A SOIL-DWELLING PEST AND SOIL-BORNE PATHOGENS OF OLIVE.**

Este trabajo aborda el primero y segundo objetivo, sus resultados permitieron seleccionar aislados con potencial insecticida para el control de estados pre-imaginales de *C. capitata* como modelo de control de *B. olea* y evidenciaron la actividad antifúngica de los extractos y dializados obtenidos de dos aislados de hongos entomopatógenos (EAMa 01/58 Su de *M. brunneum* y EABb 09/16 Su de *B. bassiana*) contra *V. dahliae* y *P. megasperma e inundata*.

Artículo publicado en la Revista: Biological Control.

M.D. Lozano-Tovar, A. Ortiz-Urquiza, I. Garrido-Jurado, A. Trapero-Casas, E. Quesada-Moraga

Biological Control: 2013, 67: 409-420.

ScienceDirect

Entomología

Factor de impacto 2013: 1873

Entomología 15/90



## Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive



M.D. Lozano-Tovar<sup>a,b</sup>, A. Ortiz-Urquiza<sup>a</sup>, I. Garrido-Jurado<sup>a</sup>, A. Trapero-Casas<sup>b,1</sup>, E. Quesada-Moraga<sup>a,1,\*</sup>

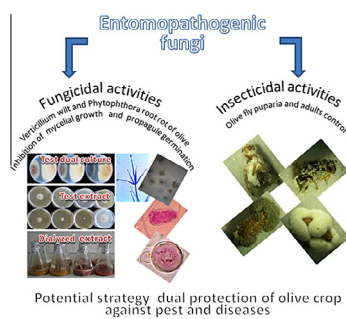
<sup>a</sup> Laboratory of Agricultural Entomology, Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio C4 Celestino Mutis, 14071 Cordoba, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Agroforestry Pathology, Department of Agronomy, ETSIAM, University of Cordoba, Campus of Rabanales, Building C4 "Celestino Mutis", Córdoba 14071, Spain

### HIGHLIGHTS

- *Beauveria* and *Metarhizium* have shown potential in soil treatments against preimaginals and adults.
- *Beauveria* and *Metarhizium* have been inspected for antifungal activity against soil-borne pathogens.
- *Beauveria* and *Metarhizium* caused 40–62% inhibition of *Phytophthora* and *Verticillium* growth rates (GR).
- Crude extracts and dialyzed of *Beauveria* and *Metarhizium* caused 100% inhibition of the pathogens GR.
- These dialyzed fractions also caused inhibition of reproductive propagules of the pathogens.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 February 2013

Accepted 10 September 2013

Available online 19 September 2013

#### Keywords:

*Bactrocera oleae*

*Beauveria* spp.

Fungal extracts

*Metarhizium brunneum*

Olive

*Phytophthora* spp

*Verticillium dahliae*

### ABSTRACT

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin) and the olive pathogens *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora inundata* are major worldwide limiting factors for olive tree production. Entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp., are suitable for olive fly control by either targeting adults or pupariating larvae and puparia in the soil beneath the tree canopy. Such soil treatments could have an additional impact on other communities of microorganisms present in the soil, such as soil-borne olive pathogens. The present work explores the possible dual biocontrol of both olive pests and diseases with entomopathogenic fungi. Twelve indigenous isolates of *Beauveria bassiana*, *Beauveria pseudobassiana*, *Beauveria varroae* and two isolates of *Metarhizium brunneum* from olive crops (soil and phylloplane) were evaluated in soil treatments against medfly (*Ceratitis capitata* Wied.) pre-imaginals. There were significant differences among the isolates in the total percentage of non-viable puparia and the total the puparia and adults showing fungal outgrowth, with percentages ranging from 27.5% to 82.5%, which highlights the potential of soil treatments with entomopathogenic fungi not only to reduce the target pre-imaginals but also the adults emerging from them, therefore contributing to the overall reduction of the next adult generation. The strains EAMa 01/58-Su of *M. brunneum* and EABb 09/16-Su of *B. bassiana* were evaluated for antifungal activity against two strains of *V. dahliae* (V117, V004), one of *P. megasperma* (PO20), and one of *P. inundata* (PO47) with one strain of *Trichoderma atroviride* used as a reference in the antagonism assays. In the dual plate culture assays, *T. atroviride* caused a 64–79% inhibition of *Phytophthora* spp. and *V. dahliae* mycelial growth. Meanwhile, the mycelial growth inhibition rates of *M. brunneum* and *B. bassiana* were 42–62% for *Phytophthora* and 40–57% for *V. dahliae*, with both entomopathogens causing inhibition halos, supporting the mechanism of antibiosis. Such a mechanism is also supported by the inhibitory activity of the crude extracts of these two *M. brunneum* and *B. bassiana*

\* Corresponding author. Fax: +34 957218440.

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

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this research.

strains against these olive pathogens. Also, after the dialysis of the crude extracts against water in a molecular porous membrane with a cut-off of 3500 Da, the antifungal activity was mostly retained (100% inhibition rates) in the dialyzed fractions, indicating that the active compounds were secondary metabolites. Likewise, these dialyzed fractions inhibited the germination of conidia (96–100%) and microesclerotia (58–96%) of *V. dahliae* and propagules of *P. megasperma* (38–100%). These results indicate that entomopathogenic fungi have the potential for dual biocontrol of olive soil pests and diseases.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

The olive tree *Olea europaea* L. (Oleaceae) is an important crop in many countries and has acquired a large socio-economic importance within the Mediterranean region (IOOC, 2012). In fact, the olive tree is planted in all regions of the globe between 30° and 45° latitude of both hemispheres. Spain, with over 320 million olive trees, is the number one producer of olive oil, at 35–40% of world-wide production, with 75% of its production coming from Andalusia (FAO, <http://faostat.fao.org/>).

The most important insect pest of the olive tree worldwide, with an emphasis in Mediterranean countries, is the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). The fly lays its eggs in the olive fruit and the larvae feed and grow in the mesocarp. The infestation leads to direct (table olives are unsuitable for consumption) or indirect (reduction in oil quality) damage (Tzanakakis, 2006). *B. oleae* (Gmelin) is largely responsible for approximately 60% of losses due to insects (Mazomenos et al., 1997) and 15% of the total crop losses, estimated at approximately 800 million euro per year (Quesada-Moraga et al., 2009).

The control of *B. oleae* is based on chemical insecticides, particularly organophosphates, which are used as bait (insecticides mixed with an attractant) or cover sprays. However, concern has arisen regarding the negative impact that such chemicals have on the olive tree ecosystem and the discovery of insecticidal resistance in some olive fly populations frequently treated with these chemicals (Daane and Johnson, 2010). Likewise, globally changing plant protection policies aim to reduce pesticide risks on the environment and human health by reducing dependence on chemical control. Thus, research on old and new control options has been reinforced (Daane and Johnson, 2010). As a result of these studies, microbial control with entomopathogenic fungi has been shown to have potential as an alternative approach to olive fly management and can complement and partially replace current chemically based olive fly adult management practices (Quesada-Moraga et al., 2009).

The olive fly is a multivoltine species, completing from 2 to 5 generations per year, as a function of the region and local conditions, mainly temperature and relative humidity (Santiago-Alvarez and Quesada-Moraga, 2007). During development, third instar larvae drop from fruits to the ground, burrow into the soil, and form a puparium, overwintering as pupa several centimeters below the soil surface (Tremblay, 1994; Alfaro-Moreno, 2005). Compared with other entomopathogenic microorganisms, entomopathogenic fungi have the advantage of contact action, which allows for the direct penetration of the host cuticle and makes them suitable for olive fly control targeting either adults or pupariating larvae and puparia in the soil beneath the tree canopy (Ekesi et al., 2007).

The entomopathogenic mitosporic ascomycetes *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp. are frequently isolated from the soils of olive orchards in Spain with several isolates of both species having the potential for olive fly adult and puparia control (Quesada-Moraga et al., 2006, 2007, 2008). To optimize the efficacy of soil treatments, the effects of temperature, moisture (Garrido-Jurado et al., 2011c) and soil physicochemical properties (Garrido-Jurado et al., 2011b) on the availability, movement, and virulence of conidia against

tephritid puparia, and even the effects of such soil treatments on the soil-dwelling non-target arthropods, have been studied (Garrido-Jurado et al., 2011a). Understanding the relationship among the insect pest, the fungi, and the environment appears to be important in their role as biological control agents.

To this end, recent evidence indicates that many of these entomopathogenic fungi play additional roles in nature, such as plant endophytes associating with the rhizosphere, plant growth-promoting agents and even antagonists of plant pathogens, which could allow for the exploitation of their full crop protection potential (Vega et al., 2009). The application of entomopathogenic fungi in the soil beneath the tree canopy for the control of pupariating larvae of *B. oleae* could have an impact on other communities of microorganisms present in the soil, such as soil-borne plant pathogens. While it has been reported that *Beauveria bassiana* (Ownley et al., 2004, 2008a,b) and *Lecanicillium* spp. (Askary et al., 1998; Benhamou and Brodeur, 2000, 2001; Kim et al., 2007, 2008) are antagonistic to plant pathogens, the potential antagonistic effect of entomopathogenic fungi against soil-borne olive pathogens remains unknown.

The soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb. and the oomycete *Phytophthora* spp. are two major constraints on olive cultivation in the Mediterranean Basin, causing *Verticillium* wilt and root rot diseases, respectively (Sánchez-Hernández et al., 2001; López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz et al., 2012). The goal of the present work is to explore the potential antagonistic activity of several strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp., selected for their virulence toward tephritid puparia against the olive soil-borne pathogens *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. and to elucidate their possible mechanisms of antagonism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insects

The olive fruit fly *B. oleae* is very hard, if impossible, to rear and manipulate under laboratory conditions (Fletcher, 1987); therefore, *Ceratitis capitata* Wied. is used worldwide as a model. Pupariating third instar *C. capitata* larvae were reared under the insectary conditions of a 16:8 h light:dark photoperiod with 50–60% relative humidity (RH) and 26 ± 2 °C. The adult flies were provided water and a standard artificial diet of yeast autolysate + sucrose (1 + 4 by weight). The larvae were reared on wheat bran + sucrose + beer yeast + nipagin + nipasol + water (20 + 5 + 1 + 0.5 + 0.5 + 10 by weight).

### 2.2. Fungal isolates

Seven indigenous strains of *B. bassiana*, three strains of *B. pseudobassiana*, two strains of *B. varroae*, and one strain of *Metarhizium brunneum* (Table 1) from the culture collection at the Department of Agricultural and Forestry Sciences and Resources (AFSR) of the University of Cordoba (Spain) were selected for screening. These strains originated from the soil, olive leaves and weeds of an organic olive orchard at Bobadilla in the Malaga province in

Southeastern Spain. A strain of *M. brunneum* EAMa 01/58-Su (accession number CECT 20764 from the Spanish Collection of Culture Types, CECT) was also selected, obtained from soil of a wheat crop at Hinojosa del Duque (Cordoba) and previously selected for its virulence against the adults and puparia of *C. capitata* (Quesada-Moraga et al., 2006). Slant monoconidial cultures were grown on malt agar (MA) (12.75 g/L malt extract, 2.75 g/L dextrin, 2.35 g/L glycerol, 0.78 g/L gelatin peptone, 15.0 g/L agar) at 25 °C in darkness and then stored at 4 °C.

Four isolates of soil-borne fungal plant pathogens were used: two of *V. dahliae* (V004, V117), one of *Phytophthora megasperma* Drechsler (PO20) and one of *Phytophthora inuncta* (PO47) (Brasier, Sanchez-Hernandez & Kirk). Plant pathogen isolates were obtained from the collection of the Laboratory of Plant Pathology at the University of Cordoba. The two *V. dahliae* isolates are representative of the defoliating (V117) and non-defoliating (V004) pathotypes causing verticillium wilt in Southern Spain (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011; Jiménez-Díaz et al., 2012), while the two *Phytophthora* isolates (PO20 and PO47) are representative of the two species causing phytophthora root rot of olive in Southern Spain (Sánchez-Hernández et al., 2001).

### 2.3. Inoculum production of entomopathogenic fungi

To produce inocula for experiments, slant cultures of the selected isolates from the collection were subcultured by conidial transfer to MA Petri plates that were grown for 15 days at 25 °C in darkness. The Petri plates were sealed with Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging Co., Chicago, IL), and freshly collected conidia from 15-day-old cultures were used for each replicate and each experiment. The conidial suspensions were prepared by scraping conidia from Petri plates into a sterile aqueous solution of 0.2% Tween 80. The conidial suspension was filtered through several layers of cheesecloth to remove mycelial mats. The concentration of conidia was assessed by using a hemocytometer (Malassez chamber) (Goettel and Inglis, 1997), and the germination rate was evaluated in Petri plates on a water agar substrate at 25 °C, 12 h after the inoculation, with values always above 95%. The conidial suspension was adjusted by diluting conidia with 0.2% Tween 80 to a final concentration of  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml.

### 2.4. Effects of entomopathogenic fungi on *C. capitata* pre-imaginals and adults

The soil used in all of the experiments was characterized as sandy-loam (78% sand, 17% silt, 5% clay, and 0.2% organic matter, pH

8.4). The soil was sieved (2 mm mesh), air-dried at 26 °C for 10 days, and sterilized prior to use. A sterile distilled water volume of 3.9 ml containing  $1.8 \times 10^8$  conidia of the isolates was added to transparent containers (80 × 80 × 55 mm) containing 30 g of soil, thus providing a concentration of  $6.0 \times 10^6$  conidia/g. According to a WP4 Decagon psychrometer (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA) that provides the total water potential as a result of the matric and osmotic components, the aforementioned water volume corresponded to a water potential of −0.47 MPa [9.0% (wt.: wt.)] (Garrido-Jurado et al., 2011a,b). A control lot of soil was treated with the same quantity of sterile distilled water containing 0.1% Tween 80. The soil was thoroughly mixed by shaking for 5 min to achieve a uniform distribution of the inoculum, and 10 pupariating late third instars of *C. capitata* were released into the soil. The containers were placed inside a large plastic container (250 × 450 mm) and were covered with damp filter paper, which was moistened periodically to maintain a ± 3% loss of the initial soil water content (Ekesi et al., 2003). In total, four replicates were conducted, and 10 insects per replicate were used for each isolate and control. The experiments were performed three times.

The puparia that failed to emerge were immediately surface disinfested with 1% sodium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water. The puparia were then placed on sterile wet filter paper in sterile Petri plates that were sealed with Parafilm and kept at 25 °C to be inspected for the development of fungal mycelia and sporulation (mycosis) on the pupae. The emerged adults were individualized in plastic boxes of 38 mm in diameter × 19 mm height and fed daily a diet containing 0.1 g hydrolyzed protein and 0.4 g sucrose per ml distilled water and their mortality was monitored over three days to ascertain the possible adult mortality via soil. The adult cadavers were inspected for the development of mycosis as previously described for the puparia.

The treatments were in a randomized complete block design with four replications. Five variables were evaluated: percentage of non-viable medfly puparia, percentage of non-viable puparia showing fungal outgrowth, percentage of non-viable puparia and adults showing fungal outgrowth and survival.

### 2.5. Effects of entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp

The antifungal activity of some entomopathogenic fungal strains selected in the pathogenicity bioassays, *M. brunneum* (EAMa 01/58-Su) and *Beauveria* spp. (EABb 09/16-Su, EABb 09/07-Fil, EABb 09/23-Su and EABv 09/01-Su), together with a commercial strain of *Trichoderma atroviride* (Tusal Newbiotechic,

**Table 1**  
Entomopathogenic fungal isolates<sup>a</sup> assayed against *Ceratitis capitata* puparia.

Fungal species	Isolate reference	Habitat	Type sequence <sup>b</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	EABb 09/03-Fil	Adventitious plant phylloplane	1
	EABb 09/04-Fil	Adventitious plant phylloplane	2
	EABb 09/05-Fil	Adventitious plant phylloplane	3
	EABb 09/07-Fil	Adventitious plant phylloplane	4
	EABb 09/11-Su	Soil	5
	EABb 09/15-Su	Soil	4
<i>B. pseudobassiana</i>	EABb 09/16-Su	Soil	6
	EABb 09/01-Fil	Olive phylloplane	7
	EABb 09/23-Su	Soil	8
<i>B. varroae</i>	EABb 09/22-Su	Soil	7
	EABv 09/03-Fil	Soil	9
<i>Metarhizium brunneum</i>	EABv 09/01-Su	Soil	9
	EAMa 09/15-Su	Soil	10
	EAMa 01/58-Su	Soil	–

<sup>a</sup> Isolates were obtained from the culture collection at AFSR Department of the University of Cordoba, Spain. Strain EAMa 01/58-Su now belonging to *Metarhizium brunneum* Petch was segregated from *M. anisopliae* accordingly to Bischoff et al. (2009).

<sup>b</sup> Type sequence obtained from EF1- $\alpha$  region (Rehner et al., 2011).

Seville, Spain) was evaluated against the mycelia growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. isolates using the dual culture test method. Four isolates of soil-borne fungal plant pathogens were used as target fungi for this study: *V. dahliae* (V004), *V. dahliae* (V117), *P. megasperma* (PO20) and *P. inuncta* (PO47). The inocula ( $5 \mu\text{L } 1 \times 10^6$  conidia/ml suspension) of entomopathogenic fungi and *V. dahliae* were placed in a hole ( $0.4 \text{ mm}^2$  diameter) 10 mm from the edge of 90 mm diameter Petri plates with potato-dextrose agar (PDA, Cultimed Panreac E.U.) culture medium, pH of the medium after sterilization was  $5.61 \pm 0.05$  date, which was measured with a potentiometer (pH Basic 20, Crison Instruments, SA Barcelona Spain). The pH of PDA medium is optimal for the growth of all microorganisms (plant pathogenic and entomopathogenic fungi) used in this study (Benitez et al., 2006; Morales-Sellero et al., 2009, Hernandez et al., 2005, Viti et al., 2008; Lopez-Escudero and Mercado-Blanco, 2011; Leger et al., 1999 Mishra and Malik, 2012). For the *Phytophthora* strains, a 3 mm diameter agar disk obtained from actively growing seven-day-old cultures was placed the same distance from the edge of the Petri plate Two groups of experiments were performed: in the first group, both entomopathogenic and plant pathogenic fungi were placed simultaneously in the Petri plate, while in the second group, plant pathogenic fungi were placed 96 h after the entomopathogenic fungi. The plates were incubated at  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $216 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fluorescent light, and 12 h period.

The control for *Verticillium* bioassay was performed by add  $5 \mu\text{L}$  of  $1 \times 10^6$  conidia/ml suspension in a hole made in the PDA medium in Petri plates. The control for *Phytophthora* bioassay was a 3 mm diameter agar disk obtained from actively growing seven-day-old cultures. In both cases, inoculum of plant pathogens was placed about 10 mm from the edge of 90 mm diameter Petri plates.

The treatments were arranged in a factorial design with two factors (entomopathogenic isolates and plant pathogenic isolates) and four replications per factor combination. The variable evaluated was the percentage of inhibition of the mycelial growth (IMG) and when the colonies of the control treatment reached the edge of the plate was determined by measuring the diameter of the colonies in each of the treatments using a digital caliber [IMG =  $100 \times (\text{colony diameter in the control} - \text{colony diameter in the treatment}) / \text{colony diameter in the control}$ ].

## 2.6. Effects of extracts of entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp

The fungal extracts of *T. atroviride*, *M. brunneum* EAMa 01/58-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su were produced in  $G_{40}P_{20}$  medium (40 g glucose and 20 g peptone per liter) as previously described (Ortiz-Urquiza et al., 2010), pH of the medium after sterilization was  $5.22 \pm 0.2$ , which was measured with a potentiometer (pH Basic 20, Crison Instruments, SA Barcelona Spain). Briefly, a primary culture inoculated with  $10^7$  conidia/ml was cultivated on a rotary shaker at 110 rpm for 4 days at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Then, 2 ml of the primary culture was transferred to a 1 L flask containing 250 ml of liquid medium. This secondary culture was cultivated for 7 days under the former conditions. The cells were filtered with Whatman paper No. 3 and centrifuged at 9000 rpm for 15 min; then, the supernatant was concentrated in a vertical flow chamber for 24 h. The final concentration of the extracts was standardized by measuring their protein content in a spectrophotometer by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as a standard at a wavelength 595 nm. The crude extracts were sterilized by filtration through 5, 0.45 and  $0.20 \mu\text{m}$  filters.

The crude extracts were added to PDA medium to obtain a final concentration of  $150 \mu\text{g}$  of soluble protein/ml and then dispensed onto 90 mm diameter Petri plates (15 ml/plate). Seven-day-old active cultures of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. were used to

obtain 3 mm diameter agar disks that were placed in the center of each Petri plate for evaluating the antifungal activity of each of the extracts. The plates were incubated at  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . The treatments were arranged in a randomized design, with four replications for each plant pathogenic isolate. The variable evaluated was the percentage of inhibition of the mycelial growth (IMG), calculated as above.

The crude extracts obtained from *M. brunneum* EAMa 01/58-Su strain and *B. bassiana* EABb 09/16-Su strain were then dialyzed against distilled water (1:20, fungal extract:water) in a molecular porous membrane (Spectra; VWR International) with a cut-off of 3500 Da for globular proteins. The dialysis was conducted with constant agitation with magnetic stirrer for 48 h at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Two fractions (adialyzed and dialyzed) were collected and subjected to evaporation in a vertical flow chamber at  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  to be adjusted to the initial volume. Then both the adialyzed and dialyzed fractions were sterilized by filtration, passing through filters of 18, 3, 0.45 and  $0.20 \mu\text{m}$  successively and then added to PDA medium to obtain the final concentration indicated above and disks of 3 mm of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. were placed as mentioned above. The pH final of both crude extracts and adialyzed and dialyzed fractions were established.

Two controls were performed in this experiment. One of them consisted of Petri plates containing PDA medium and 3 mm disks of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. placed in the center of each plate as mentioned above. The other one consisted of Petri plates containing PDA medium mixed with acidified  $G_{40}P_{20}$  medium with the same volume of treatments. The  $G_{40}P_{20}$  medium was acidified according to pH of each crude extracts and dialyzed fractions used, then disks of 3 mm of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. were placed in the center of each Petri plate The pH range of the extracts obtained in  $G_{40}P_{20}$  medium was 3.45–4.12 for *M. brunneum* isolate, 3.51–3.60 for *B. bassiana* isolate and 4.28–4.40 for the dialyzed fractions.

In another experiment, the effects of a range of dosages (from 6 to  $100 \mu\text{g}$  protein/ml) of the dialyzed fractions of *M. brunneum* and *B. bassiana* on the mycelial growth of the plant pathogens *P. megasperma* (isolate PO20), *P. inuncta* (isolate PO47) and *V. dahliae* (isolates V004 and V117) was evaluated using synthetic PDA. There were four replicates for each concentration and each plant pathogenic isolate. The controls constituted of PDA and PDA + acidified culture with the higher dose of the dialyzed medium to be assessed. Agar disks from 7-day-old cultures of plant pathogens were planted in the center of each Petri plate, which was incubated at  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . An inhibition percentage of each isolate was evaluated when the controls reached the edge of the plate. The IMG data were analyzed as stated in the experiment evaluating the effects of entomopathogenic fungi on the mycelial growth of plant pathogens.

## 2.7. Effects of dialyzed fractions from entomopathogenic fungi crude extracts on the germination of propagules of *V. dahliae* and *P. megasperma*

To obtain propagules of plant pathogenic fungi, such as mycelia, chlamydospores and oospores of *P. megasperma* and mycelia and microsclerotia of *V. dahliae*, we grew fungi on a medium containing corn meal, sand and water (CSW) in a ratio of 1:9:2, respectively, by weight (Trapero and Jiménez, 1985). The final pH of CSW medium was  $6.58 \pm 0.02$  and it was established as the average of three samples of 40 g of CSW. Each sample was flooded with water, stirred vigorously for 15 s repeating five times every 5 min, allowed to stand for 30 min, and then we proceeded to do the reading with a potentiometer (pH Basic 20, Crison Instruments, S.A Barcelona Spain) (Eckert and Thomas, 2009). The sand was sifted through a 2 mm sieve and dried in an oven for 48 h at



105 °C once the mixture assembled. Then, 400 g were placed in a 1 L Erlenmeyer flask and sterilized for 1 h at 120 °C. Each Erlenmeyer flask was inoculated with 20 disks of 5 mm diameter from a 7-day-old actively growing PDA culture of plant pathogens and incubated at 22 °C ± 2 °C. At the time of the appearance of the microsclerotia of *V. dahliae* in the CSW medium, the conidia and mycelia were removed by drying the colonized CSW medium in a constant airflow at 30 °C for 7 days. The flasks inoculated with *Phytophthora* isolates were incubated in darkness for 30 days.

The effects of dialyzed fractions and crude extracts on the germination of *V. dahliae* microsclerotia was evaluated in 100 ml flasks to which 1 g of CSW containing  $1 \times 10^6$  microsclerotia and 0.5 ml of the entomopathogenic fungus crude extract or dialyzed fractions (150 µg protein/ml) were added and incubated for 48 h. Then, 100 ml of sterile distilled water was added, and the flasks were placed at 25 °C in a rotary shaker (CFL 1092) at 250 rpm for 1 h. The flask suspension was spread onto a modified sodium polypectate agar (MSPA) medium (López-Escudero et al., 2003) using 1 ml per plate. The MSPA seeded Petri plates were incubated at 22 ± 2 °C for 14 days, after which the number of *V. dahliae* colonies obtained from germinated microsclerotia was quantified under a stereoscopic microscope (Nikon SMZ-2T). The controls were prepared as follow: the first control was 1 g of CSW containing  $1 \times 10^6$  microsclerotia was added 0.5 ml sterile distilled water and second control was 1 g of CSW containing  $1 \times 10^6$  microsclerotia was added 0.5 ml dialyzed G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> medium, previously acidified according to the average pH of crude extracts and dialyzed fractions, then proceeded as in the treatments. To evaluate the effect of the dialyzed fractions of entomopathogenic fungi and crude extracts against *P. megasperma* propagules, 2 g of CSW medium colonized by *P. megasperma* and 1 ml of each crude extract and dialyzed fraction (150 µg protein/ml) were incubated for 48 h in 100 ml flasks. Then, 20 ml of sterile distilled water was added and the flasks were stirred for 10 min. One milliliter of the flask suspension was spread onto the NARPH selective medium for *Phytophthora* spp. and incubated at 25 °C for 48 h (Romero et al., 2007). Finally, the plates were washed with tap water and incubated for another 48 h, and the colony-forming units (CFU) were counted. Two controls were prepared as follow: the first control was 2 g of CSW medium colonized by *P. megasperma* was mixed with 1 ml of sterile distilled water and other control was 2 g of CSW medium colonized by *P. megasperma* mixed with dialyzed G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> medium, previously acidified according to the average pH of crude extracts and dialyzed fractions, and then proceeded as above.

The effects of dialyzed fractions and crude extracts on the germination of *V. dahliae* conidia was evaluated in sterile Eppendorf tubes by adding 1 ml of the dialyzed fraction and 1 ml of a conidial suspension ( $1 \times 10^3$  conidia/ml) of each isolate (V004 and V117). The tubes were incubated for 24 h at 22 °C, and then 20 µL was spread on 1.8% water agar Petri plates. The germination was assessed 24 h after seeding the plates. Two control treatments were established. The first control was 1 ml sterile distilled water mixed with 1 ml of the conidial suspension ( $1 \times 10^3$  conidia/ml) of each isolate (V004 and V117), and the second control was 1 ml of dialyzed G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> medium, previously acidified according to the average pH of the extracts and dialyzed fractions used in this study and mixed with 1 ml of the conidial suspension ( $1 \times 10^3$  conidia/ml) of each isolate (V004 and V117).

In all assays, there were three plates per replicate, and the assays were conducted two times. The percentage of inhibition of germination of fungal propagules was calculated for each treatment, considering the germination in first control by the formula: % IG = [100 × (microsclerotia Conidia or propagules germinated in the first control – Conidia or propagules germinated in the treatment) / Conidia or propagules germinated in the first control].

## 2.8. Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the statistical package Statistix<sup>®</sup> 9 (Analytical Software, Tallahassee, FL). Because all data were expressed as percentage, they were checked to meet the assumptions of normality (Shapiro–Wilk's test) and homogeneity of variances (O'Brien's test). When necessary, data transformation used to fulfill the ANOVA requirements was not necessary and ANOVA was performed on the original data without transformation, eliminating from the analysis mean values that showed 100% inhibition and zero variance. When ANOVA showed significant differences between treatments, means were separated using Tukey's HSD test. When the original and transformed data did not meet the ANOVA requirements, the Kruskal–Wallis nonparametric test was used and mean rank of treatments were compared using Dunn's test at  $P = 0.05$ . Linear regression was used to evaluate the inhibition of mycelial growth of plant pathogens over the logarithm of the dose of dialyzed fraction from entomopathogenic fungi. The regression lines of plant pathogenic isolates were compared based on their homogeneity of variances, slopes, and intercepts using Statistix<sup>®</sup> 9.

## 3. Results

### 3.1. Effects of entomopathogenic fungi on pre-imaginals and adults of *C. capitata*

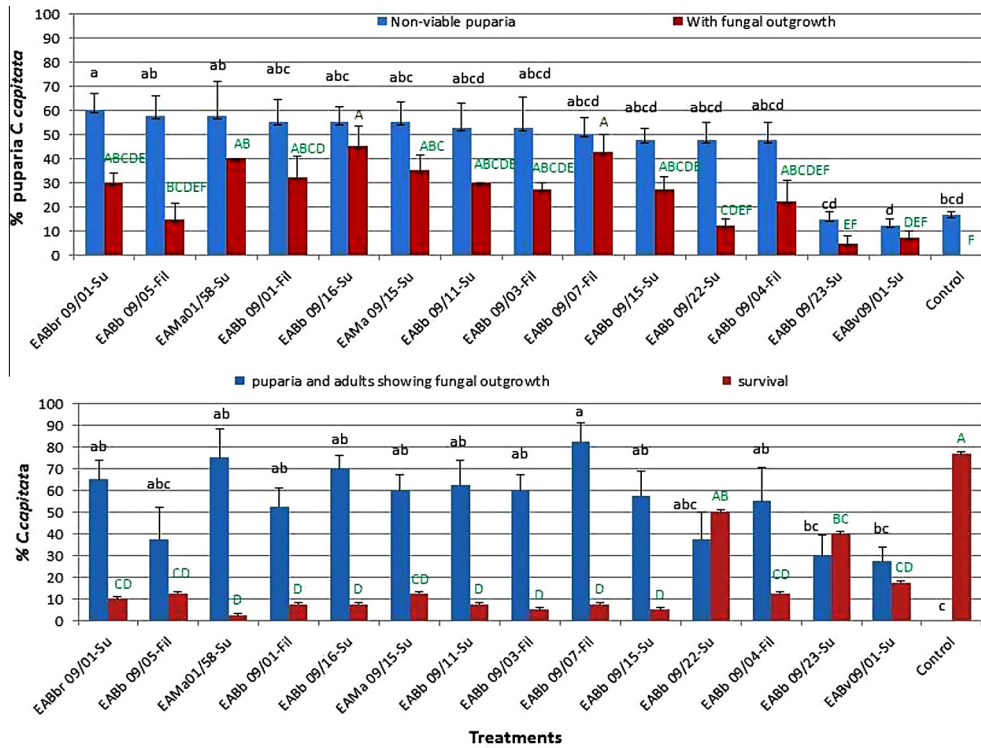
The evaluation of the variable non-viable puparia showed significant differences between isolates ( $P = 0.0002$ ). The range of non-viable puparia was between 12.5% and 60%. On the other hand, significant differences among isolates were observed in the percentage of non-viable puparia showing fungal outgrowth ( $P < 0.0001$ ), with isolates EABb 09/16-Su, EABb 09/07-Fil and EAMa 01/58-Su causing the higher percentages, 45.0%, 42.5% and 40.0%, respectively (Fig. 1).

Significant differences were also detected in the total percentage of puparia and adults showing fungal outgrowth ( $P < 0.0001$ ), with isolates EABb 09/07-Fil, EAMa 01/58-Su and EABb 09/16-Su causing the highest percentages 82.5%, 75.0% and 70.0%, respectively. Likewise, there were significant differences among isolates in adult survival ( $P < 0.0001$ ), with percentages varying between 2.5% and 50.0%. Survival of the controls was 76.6% (Fig. 1).

### 3.2. Effects of entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp

The entomopathogenic isolates showed an antagonistic activity against plant pathogenic isolates, with the percentage of growth inhibition ranging from 40.3% to 79.7% (Table 2). However, the interaction between antagonistic and plant pathogenic fungi was significant ( $P < 0.001$ ). Individual ANOVA for each plant pathogenic isolate showed differences among antagonistic fungi ( $P < 0.0001$ ). The most effective and least effective antagonistic isolates tested against the four plant pathogenic isolates were, respectively, *T. atroviride* and *M. brunneum* seeded simultaneously. The antagonistic activity of the other entomopathogenic fungi with antagonistic activities depended on the target plant pathogenic isolate (Table 2).

The isolate of *T. atroviride* presented inhibition rates between 64.9% and 79.7% (Table 2), but no halos of inhibition were observed. This antagonistic fungus completely covered the surface of the culture medium 7 days after inoculation, reaching a total sporulation on the plant pathogens 15 days after inhibition. Meanwhile, the isolates EAMa 01/58-Su of *M. brunneum* and EABb 09/



**Fig. 1.** Pathogenicity of *Beauveria* sp. and *Metarhizium brunneum* strains to *Ceratitis capitata* pre-imaginals and adults in soil treatment bioassay. Isolates were obtained from the culture collection at AFSR Department of the University of Cordoba, Spain (see Table 1). Each percentage is the average of 4 replications of 10 insects  $\pm$  standard error of the mean. In each column, means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected Tukey HSD test at  $P = 0.05$ .

**Table 2**

Inhibition of mycelial growth of *Phytophthora megasperma*, *P. inundata* and *Verticillium dahliae* grown on PDA medium in dual cultures with several antagonistic fungi.

Antagonistic fungus	Plant pathogenic isolate <sup>a</sup>			
	PO20	PO47	V004	V117
<i>T. atroviride</i>	79.7 $\pm$ 0.7 a <sup>b</sup>	71.6 $\pm$ 0.7 a	68.3 $\pm$ 3.7 a	64.9 $\pm$ 2.4 a
<i>M. brunneum</i> EAMa 01/58-Su (simultaneous seeding)	46.7 $\pm$ 0.3 d	42.1 $\pm$ 0.8 bd	40.3 $\pm$ 0.9 d	42.4 $\pm$ 0.7 c
<i>M. brunneum</i> EAMa 01/58-Su (4 days before seeding)	61.7 $\pm$ 0.5 b	56.7 $\pm$ 1.4 b	42.7 $\pm$ 1.3 cd	44.1 $\pm$ 0.9 c
<i>B. pseudobassiana</i> EABb 09/23-Su	47.2 $\pm$ 0.4 d	44.6 $\pm$ 0.1 d	56.6 $\pm$ 1.3 b	56.0 $\pm$ 0.7 b
<i>B. bassiana</i> EABb 09/16-Su	54.3 $\pm$ 0.9 c	51.4 $\pm$ 0.9 c	51.7 $\pm$ 2.0 bc	53.0 $\pm$ 1.8 b
<i>B. bassiana</i> EABb 09/07-Fil	54.8 $\pm$ 1.7 c	43.7 $\pm$ 0.5 d	51.7 $\pm$ 0.5 bc	56.7 $\pm$ 0.9 b
<i>B. varroae</i> EABv 09/01-Su	61.3 $\pm$ 0.4 b	45.9 $\pm$ 0.4 d	55.2 $\pm$ 0.3 bc	53.0 $\pm$ 0.4 b
ANOVA <i>F</i> test	$P = 0.000$	$P = 0.000$	$P = 0.000$	$P = 0.000$
Homogeneity of variances test <sup>c</sup>	$P = 0.225$	$P = 0.440$	$P = 0.470$	$P = 0.364$

<sup>a</sup> Isolates used were PO20 (*P. megasperma*), PO47 (*P. inundata*), V004 and V117 (*V. dahliae*).

<sup>b</sup> Percentage of inhibition of mycelial growth in relation to the corresponding control not seeded with fungal antagonists. Each percentage is the average of 4 Petri plates. In each column, means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected Tukey HSD test at  $P = 0.05$ .

<sup>c</sup> Homogeneity of variances was calculated by the O'Brien's test.

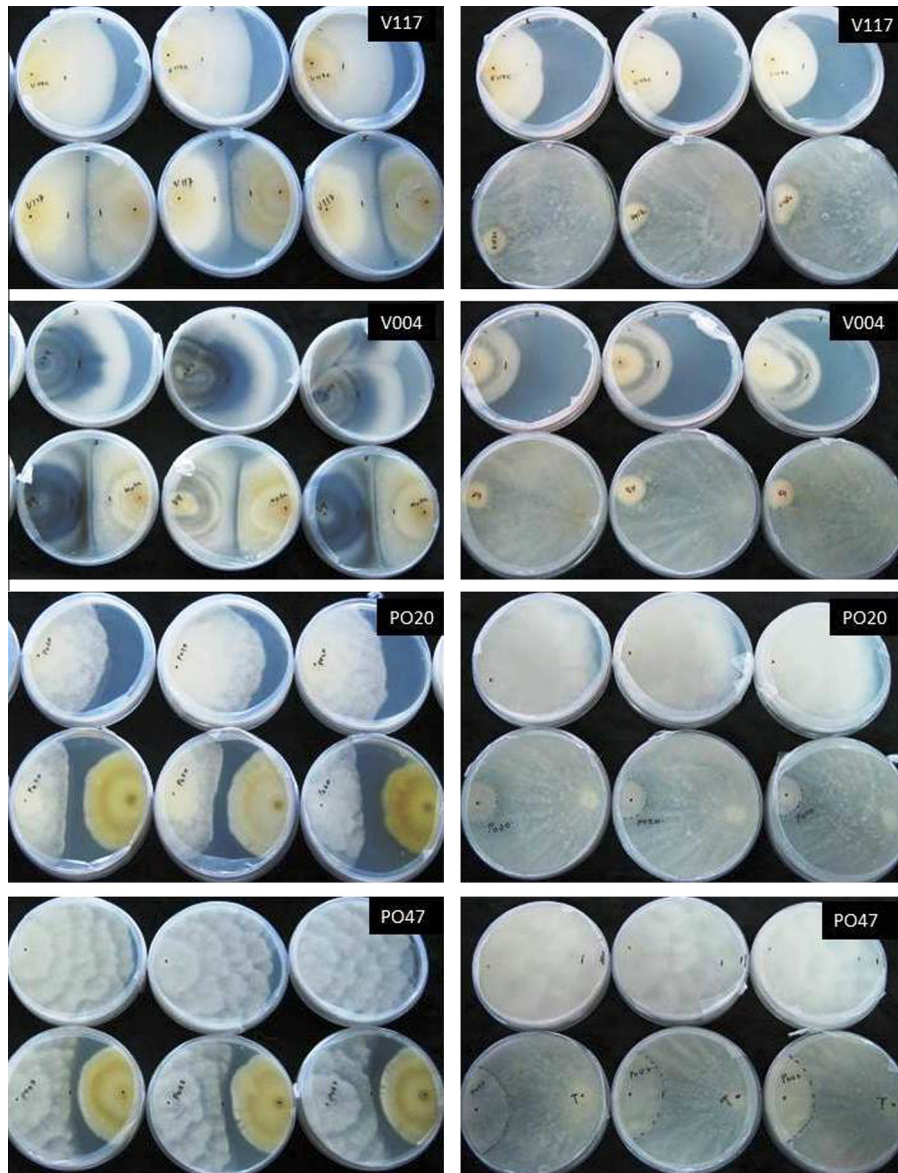
16-Su of *Beauveria* interfered with the growth of the isolates of the plant pathogens, with halos of inhibition being observed (Fig. 2). When the entomopathogenic fungus *M. brunneum* was seeded four days earlier, it increased its ability to inhibit the growth of the *Phytophthora* isolate; however, this change had no effect on *V. dahliae* isolates. The growth and sporulation of isolates EAMa 01/58-Su and EABb 09/16-Su on the mycelium developed by plant pathogenic isolates was also observed (Fig. 3).

### 3.3. Effects of crude extracts and dialyzed fractions from entomopathogenic fungi on mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp

The response of plant pathogenic isolates to the crude extracts of *M. brunneum* and *T. atroviride* was variable, while the crude extract of *B. bassiana* produced 100% of inhibition on mycelial growth of all the plant pathogenic isolates. The extracts of *M. brun-*

*neum* and *T. atroviride* had a similar effect on *P. megasperma* (PO20), with a growth inhibition of 81.3 and 73.8, respectively. On *P. inundata* (PO47), however, the growth inhibition was higher with the *M. brunneum* extract (91.5%) than with the *T. atroviride* extract (0.3%). The effects of fungal extracts on both isolates of *V. dahliae* was similar, with those from *M. brunneum* and from *B. bassiana* producing 100.0% growth inhibition and those from *T. atroviride* causing a growth inhibition of 35.3% of V117 and 34.8% of V004 (Table 3).

The dialyzed fractions of *M. brunneum* and *B. bassiana* showed 100% inhibition of mycelial growth of all plant pathogenic isolates. The adialyzed fraction, however, showed a lower activity than the dialyzed fraction against all plant pathogenic isolates, except for those of *M. brunneum*, which also completely inhibited the PO20 isolate of *P. megasperma*. The fractions of *M. brunneum*, either adialyzed or dialyzed, were more effective than those of *B. bassiana* for all plant pathogenic isolates (Table 4).



**Fig. 2.** Interactions between colonies of antagonistic and plant pathogenic fungi. Left, *Metarhizium brunneum* (EAMa 01/58-Su) vs. *Verticillium dahliae* (V117, V004), *Phytophthora megasperma* (PO20) and *P. inundata* (PO47). Right, *Trichoderma atroviride* vs. *Verticillium dahliae* (V117, V004), *Phytophthora megasperma* (PO20) and *P. inundata* (PO47). The control plates are shown on top of each picture while treatments are shown in the bottom. In dual cultures, plant pathogens are at left edge of the Petri plate and entomopathogenic fungi at the right one.

A differential response of all plant pathogenic isolates was observed in relation to the concentrations of the dialyzed fractions from *B. bassiana* and *M. brunneum*, the mycelial growth inhibition of plant pathogenic was dose related. In general, the mycelial growth inhibition increased linearly with the logarithm of the concentration of dialyzed fractions (Fig. 4 and 5).

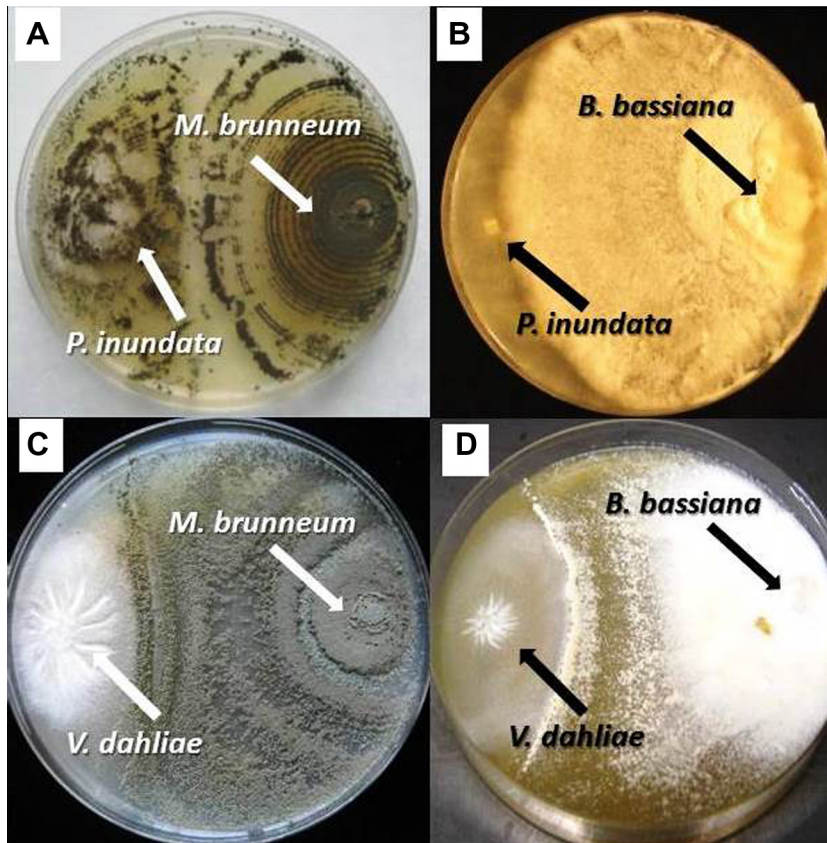
For dialyzed extracts from *M. brunneum*, the PO20 isolate of *P. megasperma* was the most sensitive ( $IC_{50} = 4.2$  and  $IC_{90} = 41.9$   $\mu\text{g}$  protein/ml), while the PO47 isolate of *P. inundata* was resilient ( $IC_{50} = 136.1$  and  $IC_{90} = 6935.8$   $\mu\text{g}$  protein/ml). The effect of the concentration of dialyzed extract from *M. brunneum* on *V. dahliae* also showed differences between isolates, with  $IC_{50}$  and  $IC_{90}$  values of 22.3 and 73.7  $\mu\text{g}$  protein/ml for isolate V004 and 15.7 and 70.3  $\mu\text{g}$  protein/ml for isolate V117, respectively (Fig. 4).

The *B. bassiana* dialyzed extract also differed in its activity as a function of the plant pathogenic isolate, with  $IC_{50}$  and  $IC_{90}$  values of 18.1 and 91.9  $\mu\text{g}$  protein/ml for PO20, 50.2 and 70.6  $\mu\text{g}$  protein/ml for PO47, 17.1 and 109.6  $\mu\text{g}$  protein/ml for V004, and 42.8 and 68.3  $\mu\text{g}$  protein/ml for V117, respectively (Fig. 5).

### 3.4. Effects of crude extract and dialyzed fractions from entomopathogenic fungi on the germination of propagules of *V. dahliae* and *P. megasperma*

The effects of dialyzed fractions and crude extracts of *M. brunneum* and *B. bassiana* on the germination of propagules of plant pathogenic isolates varied with the fungal extract and the plant pathogenic isolate. For *P. megasperma* propagules, both the crude extract and dialyzed fraction of *M. brunneum* inhibited 100% of the germination, while the crude extract and dialyzed fraction of *B. bassiana* inhibited 54.3% and 38.6% of the germination, respectively (Table 5).

For *V. dahliae* conidia, the percentage of inhibition caused by the crude extracts and dialyzed fraction from both entomopathogenic fungi were very high and varied between 96.0% and 100% with significant difference between treatments. The microesclerotia of *V. dahliae* were similarly affected by the four extracts, but inhibition of germination varied between 58.6% and 96.3% with significant differences between treatments (Table 5).



**Fig. 3.** Entomopathogenic fungi covering the mycelial growth of plant pathogenic. Left upper plate, *Metarhizium brunneum* (EAMa 01/58-Su) on *Phytophthora inundata* A; right upper plate, *Beauveria bassiana* (EABb 09/16-Su) on *Phytophthora inundata* B; Left nether *Metarhizium brunneum* EAMa 01/58 plate on *Verticillium dahliae* C; right nether *Beauveria bassiana* (EABb 09/16-Su) on *Verticillium dahliae* D.

**Table 3**  
Inhibition of mycelial growth of four plant pathogenic isolates grown on PDA medium amended with crude extracts of *Trichoderma atroviride* and of the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* (EAMa 01/58-Su) and *Beauveria bassiana* (EABb 09/16-Su).

Antagonistic fungus	Plant pathogenic isolate <sup>a</sup>			
	PO20	PO47	V004	V117
<i>T. atroviride</i>	73.8 ± 7.1 b <sup>b</sup>	0.3 ± 0.2 c	34.8 ± 1.8 b	35.3 ± 1.7 b
<i>M. brunneum</i> EAMa 01/58-Su	81.3 ± 2.6 b	91.5 ± 0.6 b	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a
<i>B. bassiana</i> EABb 09/16-Su	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a
ANOVA F test	<i>P</i> = 0.006	<i>P</i> = 0.000	<i>P</i> = 0.000	<i>P</i> = 0.000
Homogeneity of variances test <sup>c</sup>	<i>P</i> = 0.289	<i>P</i> = 0.136	<i>P</i> = 0.254	<i>P</i> = 0.189

<sup>a</sup> Isolates of *P. megasperma* (PO20) *P. inundata*, (PO47 and two isolates of *V. dahliae* (V004, V117) were used.

<sup>b</sup> Percentage inhibition of mycelial growth in relation to the corresponding control on PDA without fungal extract. Each percentage is the average of 4 Petri plates ± standard error of the mean. For each plant pathogenic isolate, means with the same letter are not significantly different according to Fisher's protected Tukey HSD test at *P* = 0.05 (*n* = 12).

<sup>c</sup> Homogeneity of variances was calculated by the O'Brien's test.

#### 4. Discussion

While entomopathogenic fungi have been viewed as having only one role, i.e., natural regulation and microbial pest control, it has been recently discovered that several entomopathogenic hypocrealean ascomycetes may exhibit additional econutritional modes, thereby exploiting not only animal but also fungal and plant resources. The objective of this multidisciplinary research was to investigate and explore the possible dual biocontrol of both olive pests and diseases with entomopathogenic fungi.

The pre-selection trials using isolates of *Beauveria* spp and *Metarhizium* spp from soil and olive leaves for the control of the medfly puparia showed that there were significant differences among isolates in the total percentage of non-viable puparia and non-viable

puparia showing fungal outgrowth, with percentages ranging from 5.0% to 45.0%. These results agree with those obtained by Eldesouki-Arafat et al. (2007), who obtained growth of *B. bassiana* on *C. capitata* puparia with percentages from 3.3% to 43.0% and a mortality range from 16.7% to 73.3% for a *M. anisopliae* isolate. Garrido-Jurado et al. (2011b) obtained a mortality range on *C. capitata* puparia between 43.3% and 83.3% when soils were treated with a conidial suspension of *M. anisopliae* and between 10.0% and 33.3% when soils were treated with a conidial suspension of *B. bassiana* suspension conidia. Several investigations have demonstrated that preimaginal stages of tephritids, particularly puparia, are less susceptible to entomopathogenic fungi (Ekesi et al., 2007, 2002; Kaaya and Munyinyi, 1995), may be due to the cuticle of the third stage larvae remains in the tephritids to form the puparium

**Table 4**

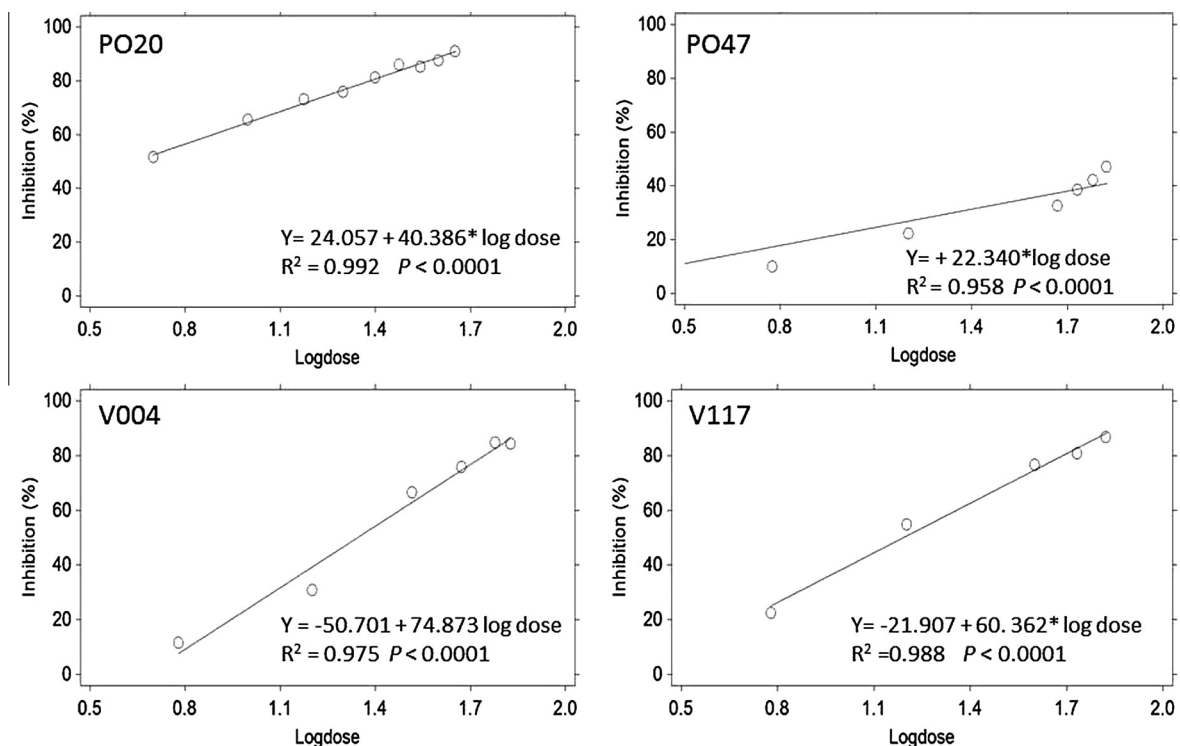
Inhibition of mycelial growth of four plant pathogenic isolates (two isolates of *Verticillium* and two isolates of *Phytophthora*) grown on PDA medium amended with dialyzed and adialyzed fractions of the crude extract from *Beauveria bassiana* EABb 09/16-Su and *Metarhizium brunneum* EAMa 01/58-Su isolates.

Extract fraction	Plant pathogenic isolate <sup>a</sup>			
	PO20	PO47	V004	V117
Dialyzed <i>M. brunneum</i>	100.0 ± 0.0 a <sup>b</sup>	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a
Adialyzed <i>M. brunneum</i>	100.0 ± 0.0 a	63.0 ± 0.81 b	84.3 ± 0.47 b	85.0 ± 0.40 b
Dialyzed <i>B. bassiana</i>	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a
Adialyzed <i>B. bassiana</i>	55.3 ± 2.0 b	2.8 ± 1.2 c	68.8 ± 1.18 c	71.0 ± 0.0 c
ANOVA F test	P = 0.000	P = 0.000	P = 0.000	P = 0.000
Homogeneity of variances test <sup>c</sup>	P = 0.202	P = 0.250	P = 0.165	P = 0.180

<sup>a</sup> Isolates of *P. megasperma* (PO20) *P. inundata*, (PO47) and two isolates of *V. dahliae* (V004, V117) were used.

<sup>b</sup> Percentage inhibition of mycelial growth in relation to the corresponding control on PDA without fungal extract. Each percentage is the mean of 4 Petri plates ± standard error of the mean. For each plant pathogenic isolate, means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected Tukey HSD test at  $P = 0.05$  ( $n = 16$ ).

<sup>c</sup> Homogeneity of variances was calculated by the O'Brien's test.



**Fig. 4.** Linear regression of the percentage of inhibition of mycelial growth of four olive pathogens over the logarithm of the dose of the dialyzed extract from *Beauveria bassiana*. The four plant pathogenic isolates were PO20 (*Phytophthora megasperma*), PO47 (*P. inundata*), V004 (non-defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*) and V117 (defoliating pathotype of *V. dahliae*).

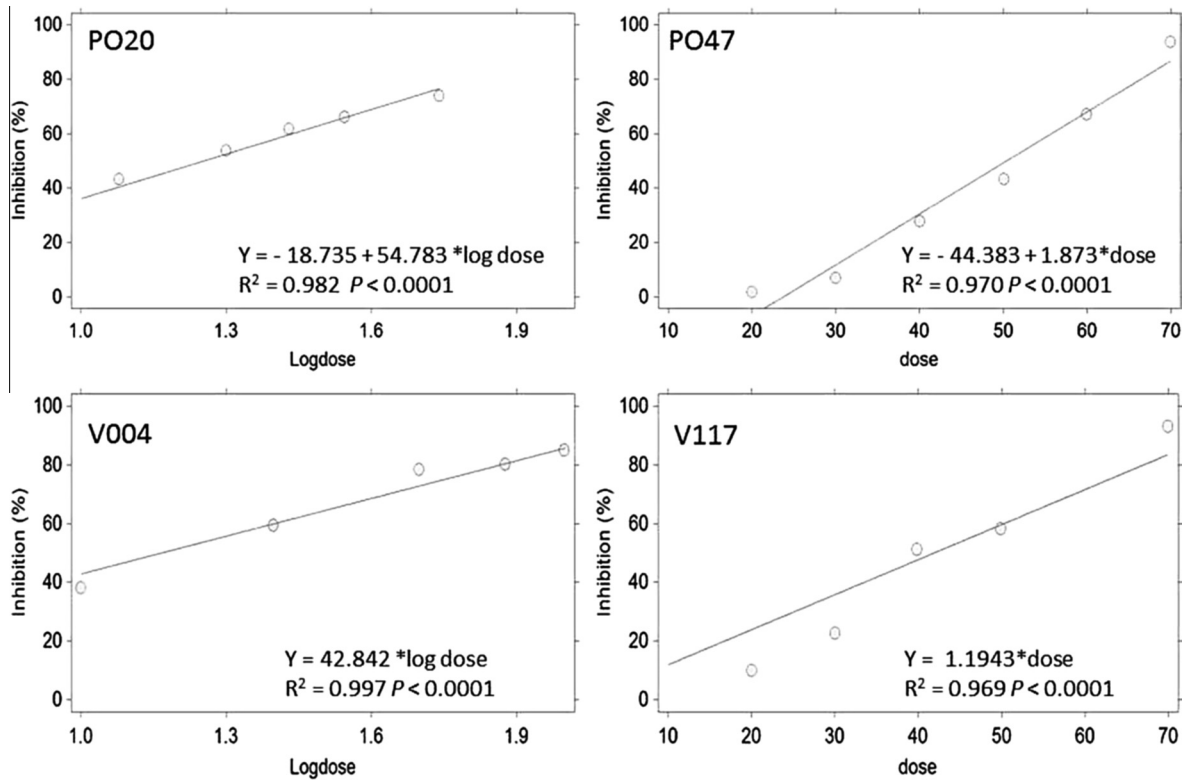
conferring a barrier to penetration and output of these fungal bio-control agents. Furthermore, according to Vanninen et al. (1999), stages of insects living in the soil may have developed high levels of resistance to infection by natural selection because fungal entomopathogens are widespread in soil. Cossentine et al. (2010) achieved high mycosis on larvae of *Rhagoletis indifferens* but low on pupae which ranged between 23% and 35%.

Interestingly was the analysis of survival, in treatments with entomopathogenic fungi, the insect survival range was 2.5–50% among isolates, while in the control treatment the insect survival was 76.6%. It is also important to note the mycosis of adults emerging from puparia three days after emergence, which highlights the potential of soil treatments with entomopathogenic fungi not only to reduce the target pre-imaginals but also the adults emerging from them, therefore contributing to the overall reduction of the next adult generation. Meanwhile, the horizontal transmission among such adults may occur before death; therefore, auto

disseminating the fungal inoculum could be possible in the pest population (Quesada-Moraga et al., 2006, 2008).

*Beauveria* spp. and *Lecanicillium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) have recently been shown to engage in plant-fungus interactions (Vega et al., 2008, 2009; Ownley et al., 2004) and both have been reported to effectively suppress plant disease, with more than one mode of action (i.e., antibiosis, competition, endophytic colonization-related effects, etc.) operating in such suppression (Goettel et al., 2008; Ownley et al., 2010; Kim et al., 2010). Our work also indicates that the antifungal effect of the selected fungal strains, either entomopathogenic fungi or *T. atroviride*, against the main olive root rot pathogens was due to different modes of action.

*T. atroviride* in the antagonism assays mainly inhibited the mycelial growth of plant pathogens by competition for substrates and nutrients (i.e., carbon, nitrogen, and various microelements). Similar results were obtained by Jabnoun-Khiareddine et al. (2009) when they evaluated several species of *Trichoderma* on



**Fig. 5.** Linear regression of the percentage of inhibition of mycelial growth of four olive pathogens over the logarithm of the dose of the dialyzed extract from *Metarhizium brunneum*. The four plant pathogenic isolates were PO20 (*Phytophthora megasperma*), PO47 (*P. inundata*), V004 (non-defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*) and V117 (defoliating pathotype of *V. dahliae*).

**Table 5**

Effect of the dialyzed fractions of entomopathogenic fungi on the germination of propagules of *Phytophthora megasperma* (isolate PO20) and *Verticillium dahliae* (isolates V004, V117).

Treatments	Inhibition of germination (%)		
	<i>P. megasperma</i> Propagules <sup>a</sup>	<i>V. dahliae</i> conidia	<i>V. dahliae</i> microsclerotia
Control pH	5.0 ± 5.8 c <sup>b</sup>	21.0 ± 7.0 b	3.3 ± 1.7 c
Crude extract of <i>Metarhizium brunneum</i>	100.0 ± 0.0 a	97.2 ± 0.8 ab	76.6 ± 10.8 ab
Dialyzed extract of <i>Metarhizium brunneum</i>	100.0 ± 0.0 a	96.6 ± 1.4 ab	58.6 ± 5.2 b
Crude extract of <i>Beauveria bassiana</i>	54.3 ± 15.2 b	96.0 ± 1.0ab	73.0 ± 2.0 ab
Dialyzed extract of <i>Beauveria bassiana</i>	38.6 ± 6.8 bc	100.0 ± 0.0 a	96.3 ± 0.9 a
ANOVA <i>F</i> test/Kruskal–Wallis test	<i>P</i> = 0.000	<i>P</i> = 0.000	<i>P</i> = 0.000
Homogeneity of variances test <sup>c</sup>	<i>P</i> = 0.285	<i>P</i> = 0.0006	<i>P</i> = 0.2705

<sup>a</sup> Propagules of *P. megasperma* were mycelia and oospores formed on CSW medium.

<sup>b</sup> Percentage inhibition of propagule germination in relation to the corresponding control on PDA without fungal extract. Each percentage is the average of 6 Petri plates ± standard error of the mean. For each plant pathogenic isolate, means with the same letter are not significantly different according to the Fisher's protected Tukey HSD test at *P* = 0.05 or Kruskal–Wallis's protected Dunn test at *P* = 0.05 for *V. dahliae* conidia.

<sup>c</sup> Homogeneity of variances was calculated by the O'Brien's test.

*Verticillium* spp., with colonies of selected plant pathogens being invaded by *Trichoderma*. Growth inhibition halos were not observed, therefore ruling out antibiosis.

The isolates EABb 09/16-Su and EABb 09/07-Fil of *B. bassiana*, EABb 09/23-Su of *B. pseudobassiana* and EABv 09/01-Su of *B. varroae* inhibited between 43.7% and 61.3% of *P. megasperma* and *P. inundata* mycelial growth and between 51.7% and 56.7% of *V. dahliae* growth. As observed in *T. atroviride*, the isolates of *M. brunneum* and *B. bassiana* grew and sporulated on the plant pathogens. Our results also show that such a mechanism mediates the antifungal effect of *T. atroviride* against *V. dahliae*, with an inhibition of vegetative growth, decrease in the production and germination of microsclerotia, hyphal fragmentation and inhibition of chlamydo-

spore formation (Jabnoun-Khiareddine et al., 2009). Previous reports using entomopathogenic fungi as antagonists of plant pathogens are scarce, with most studies related to plant disease suppression by endophytic strains of *B. bassiana* reported to reduce diseases caused by soil-borne plant pathogens, such as *Pythium*, *Rhizoctonia*, and *Fusarium*. Likewise, endophytic strains of *Lecanicillium* spp. are known to reduce diseases caused by powdery mildews and various rust fungi via mechanisms such as antibiosis and induced plant systemic resistance (Clark et al., 2006; Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010, 2008b).

In the present study, inhibitory halos were observed when the plant pathogens and entomopathogenic isolates were growing on the same plate, suggesting an additional antagonistic mechanism,

antibiosis, based on the release of extracellular substances to the culture medium that suppressed the mycelial growth of *V. dahliae* and *Phytophthora* spp. This mechanism is also supported by the inhibitory activity of the fungal extracts of these strains against the olive pathogens. When the extracts of *B. bassiana* (EABb 09/16-Su), *M. brunneum* (EAMa 01/58-Su) and *T. atroviride* were assessed at a concentration of 100 µg protein/ml, the inhibition of mycelial growth in all plant pathogens exposed to different extracts varied with the isolate. Interestingly, the effect of the crude extract of *T. atroviride* was the lowest, with an inhibition average of 33.5%, while the fungal extracts from of *B. bassiana* (EABb 09/16-Su) and *M. brunneum* (EAMa 01/58-Su) had an average inhibition of 100.0% and 83.2%, respectively. The extracts from *B. bassiana* (EABb 09/16-Su) and *M. brunneum* (EAMa 01/58-Su) also inhibited the germination (approximately 96.0%) of propagules of all plant pathogenic isolates.

Various researches have demonstrated that many species of fungi release extracellular substances that limit the growth and development of harmful organisms. Thus, extracts from *Penicillium* and *Aspergillus* species inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (Christophersen et al., 1999). Research using cell-free culture supernatants of the entomopathogenic fungi *L. lecanii* yielded proteolytic, lipolytic and antimicrobial activities (Gómez et al., 2004). Similarly, Den Belder et al. (1994) and Bonants et al. (1995) reported the purification and characterization of extracellular proteases from cell-free culture supernatant *Paecilomyces lilacinus* grown in different media.

The present study shows that even if there is an interaction between the fungal fraction and the plant pathogen, the inhibition of mycelial growth of the four plant pathogens was 100.0% with the dialyzed fractions, whereas the average inhibition with the adialyzed fractions was between 39.5% and 74.1%. These results indicate that antifungal activity is linked to molecules less than 3500 Da, although several molecules with antifungal activity could also be retained in the adialyzed extracts of both entomopathogenic fungi. Several investigations have related antimicrobial activity with the production of secondary metabolites released in the culture medium (Kavitha et al., 2010; Gómez et al., 2004; Aghighi et al., 2004). *Beauveria* spp. produces an array of bioactive metabolites, such as oosporein and beauvericin, which have been reported to limit growth plant pathogens *in vitro* (Ownley et al., 2010; Oller-López et al., 2005). To the best of our knowledge, there are no reports on the antifungal effect of *Metarhizium* spp. extracts.

The results of this study, together with the insecticidal effect of fungal extracts against medfly and olive fly adults reported in our previous studies (Ortiz-Urquiza et al., 2009), raise the possibility of using entomopathogenic fungi and their extracts to develop a dual biocontrol of olive pests and diseases. Our present research focuses on exploring such potential in semi-field and field trials in order to design efficient and low environmental impact alternatives for the management of the major pests and diseases affecting olive orchards. We are also interested in elucidating the active compounds responsible for the antifungal effects of the *Beauveria* spp. and *M. brunneum* crude extracts and dialyzed fractions.

## Acknowledgments

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation Project AGL2011-27646. The first author thanks the doctoral program of the system of the Iberoamerica INIAS and Colombian Agricultural Research Corporation CORPOICA. We would like to thank Mrs. Sandra Castuera Santacruz, Mr. Carlos Campos Porcuna and Mrs. Francisca Luque for their technical assistance.

## References

- Aghighi, S., Shahidi, B., Saadoun, I., 2004. First report of antifungal properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (Strain 101) against four Iranian phytopathogenic isolates of *Verticillium dahliae* a new horizon in biocontrol agents. *Biotechnology* 3, 90–97.
- Alfaro-Moreno, A., 2005. *Entomología Agraria. Los parásitos animales de las plantas cultivadas*. Edition of Cándido Santiago Álvarez. Diputación Provincial de Soria, Soria (pp. 219–221).
- Askary, H., Carriere, Y., Belanger, R.R., Brodeur, J., 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci. Technol.* 8, 23–32.
- Benhamou, N., Brodeur, J., 2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. *Phytopathology* 90, 932–943.
- Benhamou, N., Brodeur, J., 2001. Pre-inoculation of RiT-DNA transformed cucumber roots with the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, induces host defense reactions against *Pythium ultimum* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58, 133–146.
- Benitez, E., Nogales, R., Campos, M., Ruano, F., 2006. Biochemical variability of olive-orchard soils under different management systems. *Appl. Soil Ecol.* 32, 221–231.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101, 512–530.
- Bonants, P.J., Fitters, P.F., Rhijns, H., Den Belder, E., Waalwijk, C., Henfling, J.W., 1995. Basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* 141, 775–784.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Christophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J., Gram, L., Nielsen, J., Nielsen, P., Rahbaek, L., 1999. Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia* 143, 135–138.
- Clark, M., Gwinn, K., Ownley, B., 2006. Biological control of *Pythium myriotylum*. *Phytopathology* 96, S25.
- Cossentine, J., Thistlewood, H., Goettel, M., Jaronski, S., 2010. Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). *J. Invertebr. Pathol.* 104, 105–109.
- Daane, K., Johnson, M., 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 151–169.
- Den Belder, E., Bonants, P.J., Fitters, P.F., Waalwijk, C., 1994. New alkaline serine protease of *Paecilomyces lilacinus*. Patent WO94/25579.
- Eckert, D., Thomas, J., 2009. Recommended soil pH and lime requirement tests. *Cooperative Bull.* 493, 19–26.
- Ekesi, S., Maniania, N., Lux, S., 2002. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Technol.* 12, 7–17.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 157–167.
- Ekesi, S., Dimbi, S., Maniania, N.K., 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In: Maniania, K., Ekesi, S. (Eds.), *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. Research SignPosts, Trivandrum, India, pp. 239–274.
- Eldesouki-Arafat, I., Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., 2007. Aislamiento de Hongos entomopatógenos en suelos de olivar de Andalucía y su potencial para el control de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). *CIHEAM-IAMZ, Zaragoza* (Spain) (p. 99).
- Fletcher, B.S., 1987. The biology of the Dacinae fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 115–144.
- Garrido-Jurado, I., Ruano, F., Campos, M., Quesada-Moraga, E., 2011a. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biol. Control* 59, 239–244.
- Garrido-Jurado, I., Torrent, J., Barron, V., Corpas, A., Quesada-Moraga, E., 2011b. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control* 58, 277–285.
- 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*. *Biol. Control* 59, 366–372.
- Goettel, M.S., Inglis, D.G., 1997. *Fungi: hyphomycetes*. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London, UK, pp. 213–249.
- Goettel, M.S., Koike, M., Kim, J.J., Aiuchi, D., Shinya, R., Brodeur, J., 2008. Potential of *Lecanicillium* spp for management of insect, nematodes and plant diseases. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 256–261.
- Gómez, E., Álvarez, R., Fraga, R., Reyes, I., Hernández, J., Lemes, T., 2004. Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. *Biotechnol. Apl.* 21, 92–95.
- IOOC. International olive oil council. 2012. *Olivae* 117. [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org).
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Ayed, F., Mahjoub, M., 2009. Biological control of tomato verticillium wilt by using indigenous *Thichoderma* spp. *Afr. J. Plant Sci. Biotechnol.* 3, 26–36 (Special Issue 1).

- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, L.M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Dis.* 96, 304–329.
- Kaaya, G.P., Munyinyi, D.M., 1995. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 237–241.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., 2010. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL\_333. *Res. Microbiol.* 161, 335–345.
- Kim, J.J., Goettel, M.S., Gillespie, D.R., 2007. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biol. Control* 40, 327–332.
- Kim, J.J., Goettel, M.S., Gillespie, D.R., 2008. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* on potted cucumbers. *Biol. Control* 45, 404–409.
- Kim, J., Goettel, M., Gillespie, D., 2010. Evaluation of *Lecanicillium longisporum* Vertalec against the cotton aphid, *Aphis gossypii* and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* in a greenhouse environment. *Crop Prot.* 29, 540–544.
- Leger, R., Nelson, J., Screen, S., 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and a activity. *Microbiology* 145, 2691–2699.
- Lopez-Escudero, F., Mercado-Blanco, J., 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344, 1–50.
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J., 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 44, 1–50.
- López-Escudero, F., Martos, C., Blanco, M., 2003. Análisis y significado epidemiológico de la población de *Verticillium dahliae* en el suelo. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España (p. 60).
- Mazomenos, B.E., Stefanou, D., Langley, P., Pantazi-Mazomenos, A., 1997. Effects of sugar-formulated triflumuron treated targets on reproduction in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Bull. Entomol. Res.* 87, 169–172.
- Mishra, S., Malik, A., 2012. Comparative evaluation of five *Beauveria* isolates for housefly (*Musca domestica* L.) control and growth optimization of selected strain. *Parasitol. Res.* 111, 1937–1945.
- Morales-Sellero, A., Fernandez, J., Ordoñez, J., Suarez, M., Perez, J., Liñan, J., Lopez, P., Giron, I., Troncoso, A., 2009. Plant–Soil interactions in a fertigated Manzanilla de Sevilla olive orchard. *Plant Soil* 319, 147–162.
- Oller-López, J., Iranzo, M., Mormeneo, S., Oliver, E., Cuerva, J., Oltra, J., 2005. Bassianolone: an antimicrobial precursor of cephalosporolides E and F from the entomoparasitic fungus *Beauveria bassiana*. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1172–1173.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Santiago-Alvarez, C., Quesada-Moraga, E., 2009. Purification and characterization of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Manag. Sci.* 65, 1130–1139.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Borrego, A., Quesada-Moraga, E., 2010. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Pest Manag. Sci.* 66, 725–735.
- Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Quigley, N.B., Leckie, B.M., 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pest and plant pathogens. In: Lartey, R.T., Caesar, A.J. (Eds.), *Emerging Concepts in Plant Health Management*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 256–269.
- Ownley, B.H., Dee, M.M., Gwinn, K.D., 2008a. Effect of conidial seed treatment rate of entomopathogenic *Beauveria bassiana* and control of Rhizoctonia disease. *Phytopathology* 98, 118.
- Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K., Pereira, R.M., 2008b. *Beauveria bassiana* endophytic colonization and plant disease control. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 267–270.
- Ownley, B., Gwinn, K., Vega, F., 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55, 113–128.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Álvarez-Santiago, C., 2006. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 1955–1966.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J., Marahao, E., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Alvarez, C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol. Res.* 111, 947–966.
- Quesada-Moraga, E., Martín-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Álvarez-Santiago, C., 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control* 47, 115–124.
- Quesada-Moraga, E., Muñoz, F., Santiago, C., 2009. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environ. Entomol.* 38, 723–730.
- Rehner, S., Minnis, A., Sung, J., Luangsa-ard, J., Devotto, L., Humber, R., 2011. Phylogenetic systematics of the anamorphic, entomopathogenic *Beauveria*. *Mycologia* 103, 1055–1073.
- Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F., Sánchez, M.E., 2007. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in South–West Spain and Portugal. *J. Phytopathol.* 155, 289–295.
- Sánchez-Hernández, M.E., Muñoz-García, M., Brasier, C.M., Trapero Casas, A., 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant Dis.* 85, 411–416.
- Santiago-Alvarez, C., y Quesada-Moraga, E., 2007. The olive fruit fly. *Olea* 26, 60–61.
- Tzanakakis, M.E., 2006. Insects and mites feeding on olive: distribution, importance, habits, seasonal development and dormancy. In: Tzanakakis (Ed.), *Applied Entomology Library*, vol. 1. Brill, Leiden, Boston.
- Trapero, A., Jiménez, R., 1985. Etiología, importancia y distribución de la seca del garbanzo en el Valle del Guadalquivir. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Madrid, pp. 53–54.
- Tremblay, E., 1994. *Entomologia applicata*, third ed. Liguori Editore Vol III(2), pp. 152–161.
- Vanninen, I., Hokkanen, H., Tyni-Juslin, J., 1999. Screening of field performance of entomopathogenic fungi and nematodes against cabbage root flies (*Delia radicum* L. and *D. floralis* (Fall.); Diptera, Anthomyiidae). *Acta Agric. Scand.* 49, 167–183.
- Vega, F., Posada, F., Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* 46, 72–82.
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Rangel, D., Roy, H., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2, 149–159.
- Viti, C., Quaranta, D., De philippis, R., Corti, G., Agnelli, A., Cuniglio, R., Giovannetti, L., 2008. Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 309–318.



## **2. INSECTICIDAL ACTIVITY OF A DESTRUXIN-CONTAINING EXTRACT OF *Metarhizium brunneum* AGAINST *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE).**

El desarrollo de este trabajo se dio cumplimiento tercero objetivo, y se logró demostrar la alta capacidad de uno de los aislado EAMb 09/01-Su de *M. brunneum*, en secretar moléculas con actividad insecticida como las destruxinas, las cuales fueron probadas sobre adultos de *C. capitata*. Los resultados demostraron que este insecto es altamente susceptible a las destruxina A y A<sub>2</sub>, siendo el primer reporte en este sentido.

Artículo publicado en Journal of Economic Entomology.

M. D. Lozano-Tovar, I. Garrido-Jurado, F. Lafont and E. Quesada-Moraga.

Journal of Economic Entomology: 2015 108: 462-472

Entomología.

Factor de impacto últimos 5 años: 1804

Entomología 22/90



## Insecticidal Activity of a Destruxin-Containing Extract of *Metarhizium brunneum* Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

M. D. LOZANO-TOVAR,<sup>1</sup> I. GARRIDO-JURADO,<sup>1</sup> F. LAFONT,<sup>2</sup> AND E. QUESADA-MORAGA<sup>1,3</sup>

J. Econ. Entomol. 1–11 (2015); DOI: 10.1093/jee/тов041

**ABSTRACT** Tephritid fruit flies are major pests that limit fruit production around the world; they cause important damages, increasing directly and indirectly annual costs, and their management is predominantly based on the use of chemical insecticides. This research investigated the insecticidal activity of the crude extract obtained of *Metarhizium brunneum* Petch EAMb 09/01-Su strain and its capacity to secrete secondary metabolites including destruxins (dtx). Dtx A and A<sub>2</sub> had insecticidal activity against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) when administered *per os*. The crude extract of seven *Metarhizium* and one *Beauveria* isolates were evaluated *per os* against medfly adults. The crude extracts of the isolate EAMb 09/01-Su resulted in mortality ranging between 95 and 100% at 48 h. The high-pressure liquid chromatography profile showed two active peaks (F5B and F6 subfractions) related with dtx A<sub>2</sub> and dtx A, which caused 70 and 100% mortality on *C. capitata* at 48 h postfeeding, respectively. The LC<sub>50</sub> was 104.92 ppm of dtx A, contained in the F6 subfraction, and the LT<sub>50</sub> was 4.16 h at a concentration of 400 ppm of dtx A contained in the F6 subfraction. Moreover, the average survival time of adults exposed to this subfraction was 12.6 h with only 1 h of exposure. The insecticide metabolites of the F6 subfraction of the EAMb 09/01-Su isolate retained >90% of its insecticidal activity after exposure to 60°C for 2 h and 120°C for 20 min. These results highlight the potential of this strain as a source of new insecticidal compounds of natural origin for fruit fly control.

**KEY WORDS** bioinsecticide, biological control, fruit fly, insecticidal compound

The family Tephritidae, to which the fruit flies belong, comprises ~4,500 species distributed in tropical, subtropical, and temperate areas (Maddison and Bartlett 1989). The most important species of fruit flies around the world probably would be the olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin), which poses a severe economic threat for commercial olive growers and is largely responsible for ~60% of the losses in the olive crop (Haniotakis 2005, Quesada-Moraga et al. 2006). The medfly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), is a cosmopolitan pest feeding on a wide range of fruit crops in different climatic regions, and it annually produces important losses due to infestation (Dimbi et al. 2009, Chueca et al. 2013, De Villiers et al. 2013). Several species of *Anastrepha* genus are main pests in most fruit crops in tropical and subtropical countries, including Mexico, Central and South America, and the Caribbean Islands (Rull et al. 2012, Goncalves et al. 2013). *Anastrepha obliqua* (Macquart) is the most important pest of mangos in Mexico

and tropical regions of the Americas, making the production of some varieties unprofitable (Steck 2001).

The fruit flies cause direct physical damages to the fruit and secondary damages by the entry of pathogens, as well as the implications of quarantine measures and postharvest treatments. Their management is based mainly on the use of chemical insecticides in bait sprays. However, increasing concerns on the effect of such compounds on the environment and humans have prompted the search for their integrated pest management based on nonchemical control methods (Magaña et al. 2007, Alaoui et al. 2010, Imoulan et al. 2011).

Recent studies indicate the potential of entomopathogenic fungi and their insecticidal compounds for olive fly (Yousef et al. 2013) and medfly control (Castillo et al. 2000; Quesada-Moraga et al. 2006, 2008; Ortiz-Urquiza et al. 2009, 2010). Entomopathogenic fungi and their insecticidal compounds are considered safe for humans, the environment and nontarget organisms (Skrobek and Butt 2005, Boss et al. 2007, Skrobek et al. 2008, Garrido-Jurado et al. 2011). Active insecticidal proteins secreted by entomopathogenic fungi have been studied for activity against medfly and olive fly (Ortiz-Urquiza et al. 2009, 2010), and recently, a low-molecular weight fraction of a strain of a *Metarhizium* sp. has been found to have high insecticidal activity on medfly and olive fly (Yousef et al. 2013, 2014).

<sup>1</sup>Laboratory of Agricultural Entomology, Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Córdoba, Campus de Rabanales. Edificio C4 Celestino Mutis. 14071 Córdoba, Spain.

<sup>2</sup>Mass Spectrometry & Chromatography Lab-SCAI, University of Córdoba, Campus de Rabanales. Edificio Ramon y Cajal. 14071 Córdoba, Spain.

<sup>3</sup>Corresponding author, e-mail: cr2qumoe@uco.es.

Now, the extract of this strain has been characterized to determine the secondary metabolites responsible for insecticidal activity against the fruit flies.

Secondary metabolites secreted by the entomopathogenic fungi are a rich source of bioactive chemicals, including polyketide, depsipeptides, nonribosomal peptides, polyketide-peptide hybrid metabolites, and terpenoids. These compounds display a wide array of biological activities, such as antitumoral, cytotoxic, immunosuppressant, antiproliferative, antiinflammatory, antibiotic, antifungal, antiviral, insecticidal, and phytotoxic activities (Ballard et al. 2002, Pedras et al. 2002, Sarabia et al. 2004, Peng et al. 2005, Uchida et al. 2005, Lee et al. 2012, Liu and Tzeng 2012, Chun-Chi et al. 2013, Lozano-Tovar et al. 2013). Likewise, entomopathogenic fungal strains of the genus *Metarhizium* are known to produce a series of biologically active metabolites *in vitro* and *in vivo* (Skrobek et al. 2008, Liu and Tzeng 2012), such as destruxins (dtxs), cytochalasins C and D, helvolic acid, myroridins, swainsonine, tyrosine betaine, serinocyclins A and B, aurovertins, hydroxyvalicin, viridoxins, fongerins, metacytoflin, hydroxyfongerins A and B, and 12-hydroxyvalicin and hydroxyfungerin, the 7-desmethyl analog of fusarin C and (SZ)-fusarin C (Fujii et al. 2000, Uchida et al. 2005, Krasnoff et al. 2006, Zimmermann 2007, Azumi et al. 2008, Moon et al. 2008, Carollo et al. 2010). However, strains of *Metarhizium* spp. differ considerably in their metabolite profiles, with variation in destruxins production as a possible virulence or specificity factor (Amiri-Besheli et al. 1999, Wang et al. 2012). In fact, destruxins are the most widespread of the secondary metabolites produced by *Metarhizium* spp. and they are, by far, the most exhaustively researched toxins of this entomopathogenic fungus.

In this study, we evaluated the insecticidal activity of crude extracts of entomopathogenic fungal isolates belonging to genus *Metarhizium* and selected the most active of these extracts to elucidate both the molecular structure and production level of bioactive metabolites responsible for this activity. This crude supernatant has been shown in previous studies to have insecticidal activity on dipteran, lepidopteran, and coleopteran pests [*B. oleae*, *Spodoptera littoralis* (Boisduval), and *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier); Resquin-Romero et al. 2012, Yousef et al. 2013]; however, the isolation and characterization of bioactive compounds was not previously conducted.

## Materials and Methods

**Entomopathogenic Fungi.** The evaluated entomopathogenic fungal isolates are presented in Table 1. These isolates belong to the culture collection at the Agricultural and Forestry Sciences and Resources (AFSR) Department of the University of Cordoba (Spain) and were obtained from soil and phylloplane habitats. In addition, the reference strains BIPESCO 5 (*Metarhizium brunneum* Petch) and ARSEF 23 (*Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber) were provided by Prof. Herman Strasser from the

University of Innsbruck (Austria) and Prof. Richard Alan Humber from Cornell University (Ithaca, NY), respectively. The latter strain is known to produce a wide range of destruxins in culture media (Amiri-Besheli et al. 2000, Hu et al. 2006, Wang et al. 2012).

**Insects.** *C. capitata* flies, originally collected from the stock colony of El Encín (INIA, Madrid, Spain), have been maintained in the laboratory since 2004. To reduce consanguinity, wild insects from infested orange orchards at Cordoba (Spain) were introduced yearly. Flies were reared in the insectarium conditions at a photoperiod of 16:8 (L:D) h with 50–60% relative humidity (RH) and at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Adult flies were provided with water and a standard artificial diet consisting of yeast autolysate (ICN Biomedical, Aurora, OH) and sucrose (Panreac, Barcelona, Spain; 1:4 w/w). Larvae were reared on a diet of wheat bran 300 g, sucrose 75 g, brewer's yeast 38 g, nipagin 2 g, nipasol 2 g, and benzoic acid 2.4 g in 600 ml of water per kg of diet (Albajes and Santiago-Álvarez 1980).

**Production of Fungal Crude Extracts in a Liquid Medium.** Fungal extracts were produced in  $G_{40}P_{20}$  medium (40 g of glucose and 20 g peptone per liter; Ortiz-Urquiza et al. 2010). Briefly, a primary culture was inoculated with  $10^7$  conidia/ml and then cultivated on a rotatory shaker at 110 rpm for 4 d at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Subsequently, 2 ml of the primary culture was transferred to a 1-liter flask containing 250 ml of the liquid medium. This secondary culture was cultivated for 7 d under the former conditions. Cells were filtered with paper (Whatman No.3) and centrifuged at 9,000 rpm for 15 min; the supernatant was concentrated 10 times their initial volume using a vertical flow chamber for 24 h. Before performing the bioassay, the supernatants were sterilized by filtration through 0.45- and 0.20- $\mu\text{m}$  filters.

**Insecticidal Activity of Crude Extracts.** The insecticidal activity of the concentrated supernatants was assessed in a diet test. One-day-old male and female flies were collected randomly and placed in 120 by 51-mm<sup>2</sup> (diameter  $\times$  length) cages and fed with artificial diet and crude extract (test suspension: 0.4 mg of sucrose and 0.1 mg of protein-hydrolysate per ml of crude extract) on a 1.5-ml centrifuge tube cap. Controls were treated with an equivalent volume of the  $G_{40}P_{20}$  liquid medium with the above proportions of sucrose and yeast autolysate (control suspension). However, two controls were established: one with the pH of the  $G_{40}P_{20}$  culture medium (5.2) and the other was acidified according to the average pH of the crude extracts (3.74). Four replicates of 10 insects each were used for each group and for the controls. The experiment was conducted and monitored at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h. Adult mortality was recorded at 24 and 48 h after treatment.

**Obtaining of Fractions and Their Insecticidal Activity.** In an initial attempt to elucidate the active fraction that was responsible for the insecticidal activity, the concentrated supernatant of the isolate EAMb 09/01-Su was subjected to different fractionation processes. The concentrated supernatant was mixed with chloroform (1:1 v/v) and a chloroform fraction and

**Table 1. Entomopathogenic fungal isolates<sup>a</sup> assayed against *C. capitata* adult**

Fungal species	Isolate reference	GeneBank accession number	Habitat	Crop	Site of origin
<i>Metarhizium brunneum</i>	EAMb 09/01-Su	KJ158746	Soil	Holm oak forest	Castiblanco de los Arroyos, Sevilla (Spain).
	EAMb 09/02-Su	–	Soil	Holm oak forest	Castiblanco de los Arroyos, Sevilla (Spain).
	EAMa 10/12-Su	–	Soil	Olive	Bobadilla, Malaga (Spain).
<i>Metarhizium guizhouense</i>	EAMa 10/01-Fil	–	Phylloplane	Olive	Adamuz, Córdoba (Spain).
	EAMa 10/02-Fil	–	Phylloplane	Olive weed	Adamuz, Córdoba (Spain).
	EAMa 10/03-Fil	–	Phylloplane	Olive weed	Adamuz, Córdoba (Spain).
<i>Beauveria bassiana</i>	EABb 09/16-Su	KJ536056	Soil	Olive	Bobadilla, Malaga (Spain).
<i>Metarhizium robertsii</i>	EAMr 09/01-Su	KJ536064	Soil	Holm oak forest	Castiblanco de los Arroyos, Sevilla (Spain).

<sup>a</sup> Isolates were obtained from the culture collection at AFSR Department of the University of Cordoba, Spain. In addition, there were reference strains BIPESCO 5 (*M. brunneum*) and ARSEF 23 (*M. robertsii*).

aqueous chloroform fraction were obtained. The chloroform fraction was concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator Heidolph (Hei-VAP Advantaje) at 39°C and the aqueous fraction was dried in a vertical flow chamber at 28°C. Then the residue was resuspended in water and mixed with methanol (1:1 v/v), and placed at –20°C for 24 h to precipitate proteins and other compounds. The methanol fraction was filtered at 4°C, and then the methanol was evaporated and resuspended in water (Konstantopoulou et al. 2006).

The previous concentrated supernatant was dialyzed against distilled water (1:20 fungal extract: water) in a molecular porous membrane Spectra (VWR International Eurolab S.L., Barcelona, Spain) with a cut-off of 3.5 kDa for globular proteins. The dialysis process was carried out with constant agitation on a magnetic stirrer for 48 h at 4°C, yielding two fractions, dialyzed and adialyzed (retained on the membrane). The adialyzates were concentrated at 4°C by embedding the membrane in polyethylene glycol 20,000 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany), while the dialyzates were concentrated by evaporation at 28°C in a forced air incubator (Selecta model; JP Selecta S.A., Barcelona, Spain; Lozano-Tovar et al. 2013).

On the other hand, the crude soluble protein of concentrated supernatant was precipitated with ammonium sulfate (90% saturation; Panreac, Barcelona, Spain) and centrifugation at 10,000 g for 30 min. The pellets were dissolved in deionised water and desalted by dialyzing against 40 volumes of distilled water for 24 h at 4°C using dialysis tubing with a 6–8 kDa cut-off membrane (Spectrum Europe, Breda, The Netherlands). The desalted fractions were concentrated at 4°C by embedding the membrane in polyethylene glycol 20,000 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn Germany; Ortiz-Urquiza et al. 2010).

The fractions were sterilized by filtration by passing them through 0.45- and 0.20-µm filters successively. The fractions were stored at –20°C until their use. All fractions were tested for biological activity on *C. capitata* in the feeding bioassay. The fractions were mixed with the above-described proportions of sucrose and hydrolyzed protein. Three controls were established: G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium and both aqueous chloroform fraction and the methanol fraction obtained of G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium. The experiments were repeated twice.

**Purification and Structural Elucidation of the Active Compounds.** The dialyzed fraction was subjected to a silica gel chromatography column (480 by 15 mm, Silica gel 60 Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) with four different eluent conditions: EtOAc:2-propanol (1:9 v/v), EtOAc:2-propanol:MeOH (5:45:50% v/v), EtOAc:2-propanol:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:45:45:5% v/v), and EtOAc:2-propanol:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:45:40:10% v/v). All the reagents were supplied from Panreac (Barcelona, Spain). Two milliliters of dialyzed fraction were eluted with 100 ml for each system elution and carried at a flow rate of 0.7 ml/min. The solvents of the four fractions obtained were evaporated and resuspended in water and used in a bioassay against newly emerged medfly adults.

The more active fraction was submitted to high-pressure liquid chromatography (HPLC) reverse phase using a Biologic Duo Flow (Bio-Rad Inc., Richmond, CA) with a QuadTec-4 detector and a RP-C-18 column (Ascentis, Supelco, Bellefonte, PA; 10 by 10 mm by 10 µm) at a flow rate of 2 ml/min; a mobile phase linear gradient was used (80/20 H<sub>2</sub>O/MeCN to 100% MeCN in 89.8 min). The injected volume was 500 µl, and the elution was monitored at four wavelengths: 190, 200, 204, and 210 nm simultaneously.

The chromatographic spectrum of the eluted compounds was tested against *C. capitata* adults. Compounds at each peak were collected and the solvent was evaporated at 28°C in a forced air incubator and then resuspended in water and mixed with diet for feeding trials. The control treatments were prepared according to the following criteria: control 1, distilled water mixed with above described proportions of sucrose and hydrolyzed protein; control 2, culture medium acidified + EtOAc:2-propanol (1:9 v/v) in a 1:1 (v/v) proportion; and control 3, culture medium acidified + MeCN in a 1:1 (v/v) proportion. The mixture of acidified culture medium plus solvent was subjected to drying, resuspended in water, mixed with the above-described proportions of sucrose, hydrolyzed protein and food was provided to *C. capitata* adults.

The eluted active peaks were analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) in a VARIAN 1200 LCMS equipped with electrospray ionization (ESI) and triple quadrupole (QQQ; Varian, Inc. Walnut Creek, CA), and the identity of destruxins was confirmed by ultra-high-pressure liquid

chromatography (UHPLC) coupled with a high-resolution quadrupole–time of flight (qTOF) mass spectrometer Bruker-MaXis Impact UHR-q TOF (Bruker International Corporation, Reutlingen, Germany) working at 20,000 mass resolution.

#### Biological activity of the Selected Fraction.

Mean lethal concentration ( $LC_{50}$ ), mean lethal time ( $LT_{50}$ ), and the effect of exposure time on acute and chronic insecticidal activity of the F6 active subfraction against *C. capitata* were determined. Newly emerged *C. capitata* adults were fed with microtube cups containing a 100- $\mu$ l of aliquot of the above-mentioned diet containing F6 at five concentrations (25, 50, 100, 200, and 400 ppm of dtx A). Two controls were established: liquid artificial diet and culture medium ( $G_{40}P_{20}$ ) treated with 50% MeCN, the eluent was evaporated as previously described, resuspended in water, and mixed with the artificial diet. The mortality was evaluated at 18 h postfeeding. The concentration of dtx A in the active F6 subfraction was determined by comparison with a dtx A standard (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) using the VARIAN 1200 LCMS (with positive electrospray ionization, ESI).

To evaluate the effect of the exposure time on the insecticidal activity of the F6 subfraction, adult flies were fed for 1, 3, 6, 9, and 12 h with active fraction concentrated at 400 ppm of dtx A. Aliquots of the active fraction (F6 subfraction) were mixed with sucrose and hydrolyzed protein for, as mentioned in the “Insecticidal Activity of Crude Extracts” subheading. After each exposure time, adults were transferred to an untreated artificial diet. The mortality was evaluated at the following time points: 0 h postfeeding, i.e., when picking the microtube cap with treatment (acute mortality) and 18 h postfeeding (chronic mortality).

The thermostability of the insecticidal activity was determined. The crude supernatant, the EtOAc:2-propanol fraction, the F6 subfraction and the F5B subfraction were subjected to two temperatures (20 min at 120°C and 2 h at 60°C) and evaluated against *C. capitata* adults through a feeding bioassay. Three replicates of ten insects were used. The controls both water and acidified  $G_{40}P_{20}$  culture medium were mixed with proportions of sucrose and yeast autolysate, as mentioned in the “Insecticidal Activity of Crude Extracts” subheading.

**Comparative Analysis of Insecticidal Activity of both EAMb 09/01-Su Crude Extract and the F6 Sub-Fraction with Reference Strain.** The insecticidal activity of the crude extract of EAMb 09/01-Su was compared with the two reference strains BIPESCO 5 and ARSEF 23. These strains were cultivated for 15 d in  $G_{40}P_{20}$ , as described above, and the adult mortality at 24 h and the average survival time (AST) were compared. Insecticidal activity of the F6 subfraction obtained from the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su strain was compared with the F6 subfraction obtained from *M. robertsii* ARSEF 23 strain. The standard dtx A was using as control.

**Statistical Analyses.** All bioassay tests were evaluated under a randomized complete analysis of variance (ANOVA) design with 3 and 4 replicates of 10 insects each used for treatments and controls.

Percentage of adult mortality was adjusted using Abbott's formula and values of corrected mortality (%) were processed for ANOVA. Comparisons and means separations were performed using a Tukey's studentized range honestly significant difference (HSD) test at  $P = 0.05$  with the analytical software Statistic 9 for Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL).  $LC_{50}$  and  $LT_{50}$  values were calculated by probit analysis using SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

### Insecticidal Activity of the Crude Extracts.

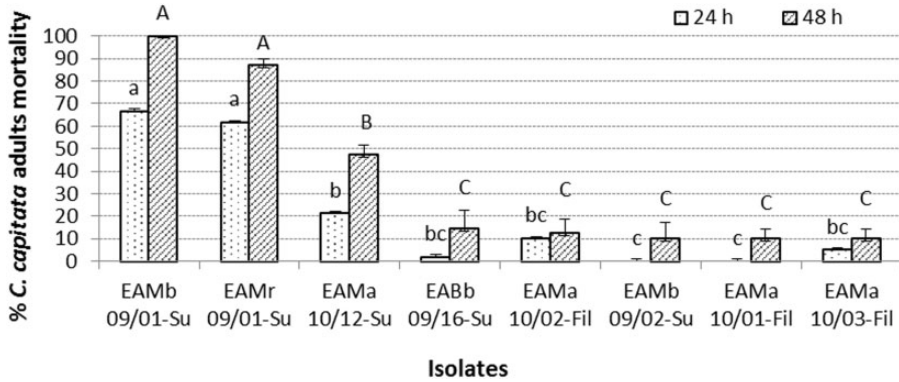
There were significant effects of the treatments with the fungal extracts on adult medfly mortality at 24 h ( $F_{7,24} = 37.81$ ;  $P < 0.0001$ ) and 48 h postfeeding ( $F_{7,24} = 52.46$ ;  $P < 0.0001$ ). At 48 h, crude supernatant of EAMb 09/01-Su isolate, showed higher toxicity, causing 100% mortality and EAMr 09/01-Su isolate caused 86.8% mortality. The range of adult mortality caused by the rest of the isolates varied from 0 to 21.2% at 24 h and from 10.0 to 47.4% at 48 h (Fig. 1). Crude supernatant of EAMb 09/01-Su isolate, therefore, was selected for the next step of the purification process.

**Insecticidal Activity of Fractions Obtained of EAMb 09/01-Su Isolate.** The mortality rates caused by fractions obtained of EAMb 09/01-Su isolate showed significant differences ( $F_{10,22} = 55.67, 86.25$ ;  $P < 0.0001$ ). The mortality rate caused by the dialyzed fraction was >95% and was statistically equal to the crude supernatant and significantly higher than the mortality caused by the adialyzed fraction (33.3–60.0%). For both fractions, the mortality rate caused by aqueous chloroform fraction and methanol fraction was 60%. The range of adult mortality caused by the rest of the fractions varied from 0 to 20.0% at 48 h (Fig. 2).

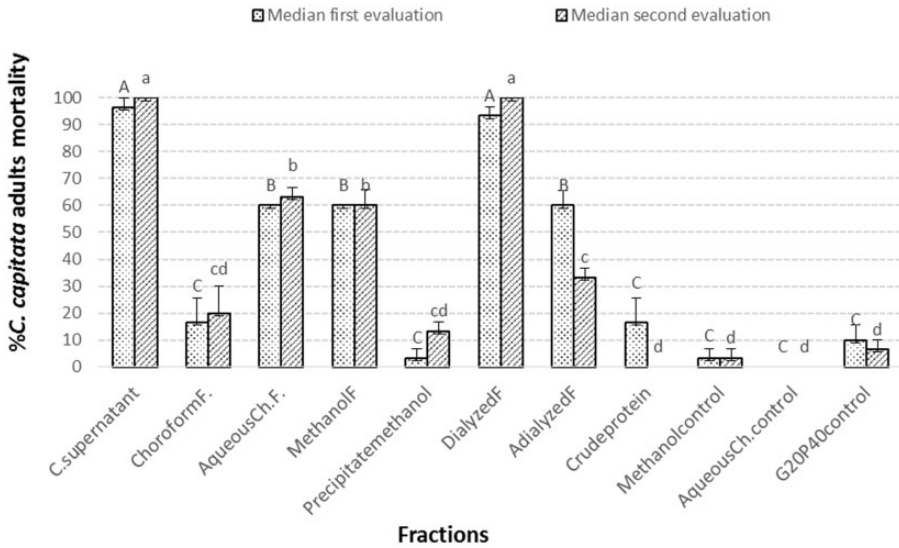
**Purification and Structural Elucidation of the Active Compounds of EAMb 09/01-Su Crude Extract.** The mortality of newly emerged *C. capitata* adults, which were fed with diets containing different fractions obtained than the dialyzed fraction using silica gel chromatography column under four eluent conditions, showed significant differences among the fractions at 24 and 48 h ( $F_{7,16} = 63.66, 335.51$ ;  $P < 0.0000$ ). Only EtOAc:2-propanol:(1:9 v/v) fraction retained the insecticidal activity of the crude extract, with adult mortalities of 86.6 and 100.0% at 24 and 48 h, respectively (Fig. 3).

The EtOAc:2-propanol fraction obtained allowed for the detection of >13 compounds with molecular masses between 453 and 611[M+H]<sup>+</sup> (ESI/Q1/MS Varian 1200 LCMS); some of the compounds were related to dtx A, A<sub>2</sub>, B, B<sub>2</sub>, and Desmethyl B (Fig. 4A). When EtOAc:2-propanol fraction was submitted to HPLC, the obtained subfractions were bioassayed against adult flies *C. capitata* adults and the insecticidal activity was significantly retained in two subfractions, F5B and F6, which caused mean mortality values of 40.0–75.0% and 75.0–100.0%, respectively (Fig. 4B).

The analysis of the LC-MS mass spectrum of F6 showed a major molecular ion peak at  $m/z$  578 at



**Fig. 1.** Activity of the crude supernatant of the entomopathogenic fungal isolates on *C. capitata* adults (mean  $\pm$  SE). Each percentage is the average of 4 replications of 10 insects  $\pm$  SE of the mean. Percentage of adult mortality at 24 and 48 h postfeeding of the crude extract was adjusted using Abbott’s formula [(corrected % = mortality % in the treated plot – mortality % in the control plot) / (100 – mortality % in the control plot)  $\times$  100]. Means with the same letter are not significantly different according to Fisher’s protected or Tukey’s HSD tests at  $P = 0.05$ . The mortality in the control treatment ranged from 0 and 10%.



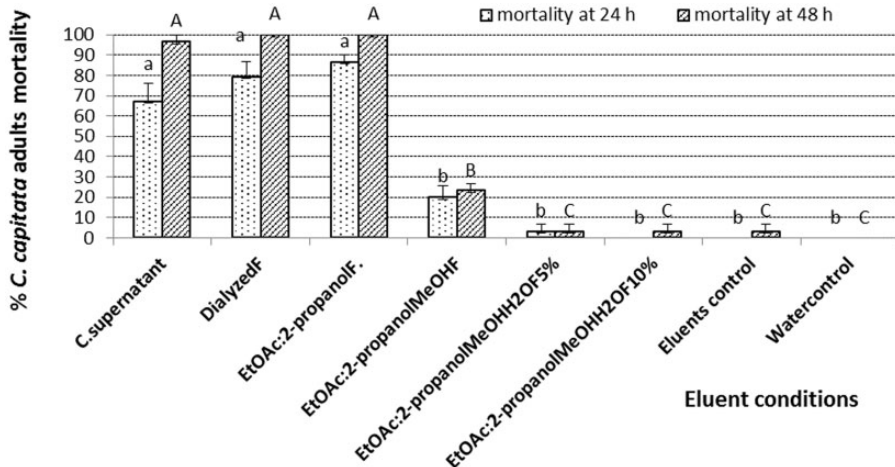
**Fig. 2.** Evaluation of fractions obtained of the crude extract of EAMb 09/01-Su isolate against *C. capitata* adults (mean  $\pm$  SE). Each value is the average of 3 replications of 10 insects  $\pm$  SE of the mean. For each fractions, means with the same letter are not significantly different according to Fisher’s protected or Tukey’s HSD tests at  $P = 0.05$ .

8.3 min that correspond to dtx A. In addition, the analysis of the LC-MS mass spectrum of F5B showed a major molecular ion peak at  $m/z$  564 at 7.6 min, which was related with dtx A<sub>2</sub>. Thus, the results of the mass spectral analysis were confirmed by UHPLC coupled to UHR-QTOF/ESI/MS (Maxis Impact, Bruker). The score of molecule formula C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> was 100%. The production of dtx A was determined in crude concentrated supernatant, in the dialyzed fraction and in the F6 subfraction by comparison with a dtx A standard (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) using the VARIAN 1200 LCMS (with positive ESI). The results obtained show high efficiency in the process of extraction. The ranges of dtx A contained in crude supernatant, in the dialyzed

fraction, and in the F6 subfraction were 631.35, 660.96, and 505.92 ppm, respectively.

**Chronic and Acute Biological Activity of the purified Active Compounds Against Newly Emerged *C. capitata* Adults.** There was a dose-related mortality of newly emerged *C. capitata* adults fed with increasing concentrations of F6 subfraction (25, 50, 100, 200, and 400 ppm of dtx A in F6) with mortality rates ranging between 10 and 70% at 18 h. The LC<sub>50</sub> value was 104.97 ppm of dtx A in F6. The LC<sub>50</sub> for control (standard dtx A) was similar with 109.11 ppm (Table 2).

The exposure time of newly merged *C. capitata* adults to the F6 subfraction showed a significant effect



**Fig. 3.** Mortality percentage of *C. capitata* caused by fractions of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate obtained by silica gel column chromatography. Mortality percentage at 24 and 48 h of exposure to fractions obtained under four different eluent conditions: EtOAc:2-propanol:(1:9 v/v); EtOAc:2-propanol:MeOH (5:45:50% v/v); EtOAc:2-propanol:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:45:45:5% v/v); and EtOAc:2-propanol:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:45:40:10% v/v). Means with the same letter are not significantly different according to Fisher's protected or Tukey's HSD tests at  $P = 0.05$ .

on the mortality rates at 0 h ( $F_{6,14} = 47.30$ ;  $P < 0.0001$ ) and 18 h ( $F_{6,14} = 143.42$ ;  $P < 0.0001$ ) after being transferred to untreated diet. One-hour exposure time was statistically different from other exposure times both at 0 and 18 h postfeeding. The mortality rates were 80–100% at 18 h for 3, 6, 9, and 12 h exposure times (Table 3). There were also significant differences among AST values that ranged from 2.8 h after 6 h of exposure to 12.7 h after 3 h of exposure (Table 3).

**Effect of Temperature on the Insecticidal Activity of the Fractions Produced by the EAMb 09/01-Su Strain.** The insecticidal activity of the crude supernatant, the EtOAc:2-propanol fraction, F6 subfractions showed stability to temperature treatments to which they were subjected. The mortality range was maintained >90%. The insecticidal activity of F5B subfraction treated for 2 h at 60°C was not significantly affected. However, exposure to 120°C for 20 min significantly reduced the insecticidal activity of the F5B subfraction by ~60% (Table 4).

**Comparative Analysis of Insecticidal Activity of Both the EAMb 09/01-Su Crude Extract and the F6 Subfraction with the Reference Strains.** Adult fly mortality caused by the EAMb 09/01-Su crude supernatant (96.6%) did not differ significantly from that caused by the ARSEF 23 crude extract (93.0%), and both extracts caused higher mortality than one produced by the BIPESCO 5 strain (75.1%). A similar pattern was observed for the AST of treated flies (Table 5). Moreover, the F6 subfractions of the EAMb 09/01-Su and ARSEF 23 strains at 400 ppm of dtx A were equally toxic to the adult flies at 18 h with mortality values of 90.0 and 97.0%, respectively,  $TL_{50}$  for F6 subfraction of the EAMb 09/01-Su, ARSEF 23, and standard dtx A was similar with value of 4.13, 5.29, and 5.46 h, respectively, whereas the AST of the flies exposed to the F6 subfraction of EAMb 09/01-Su strain

was shorter (7.7 h) than the one of the ARSEF 23 strain (9.2 h) and standard dtx A (10.4 h; Table 6).

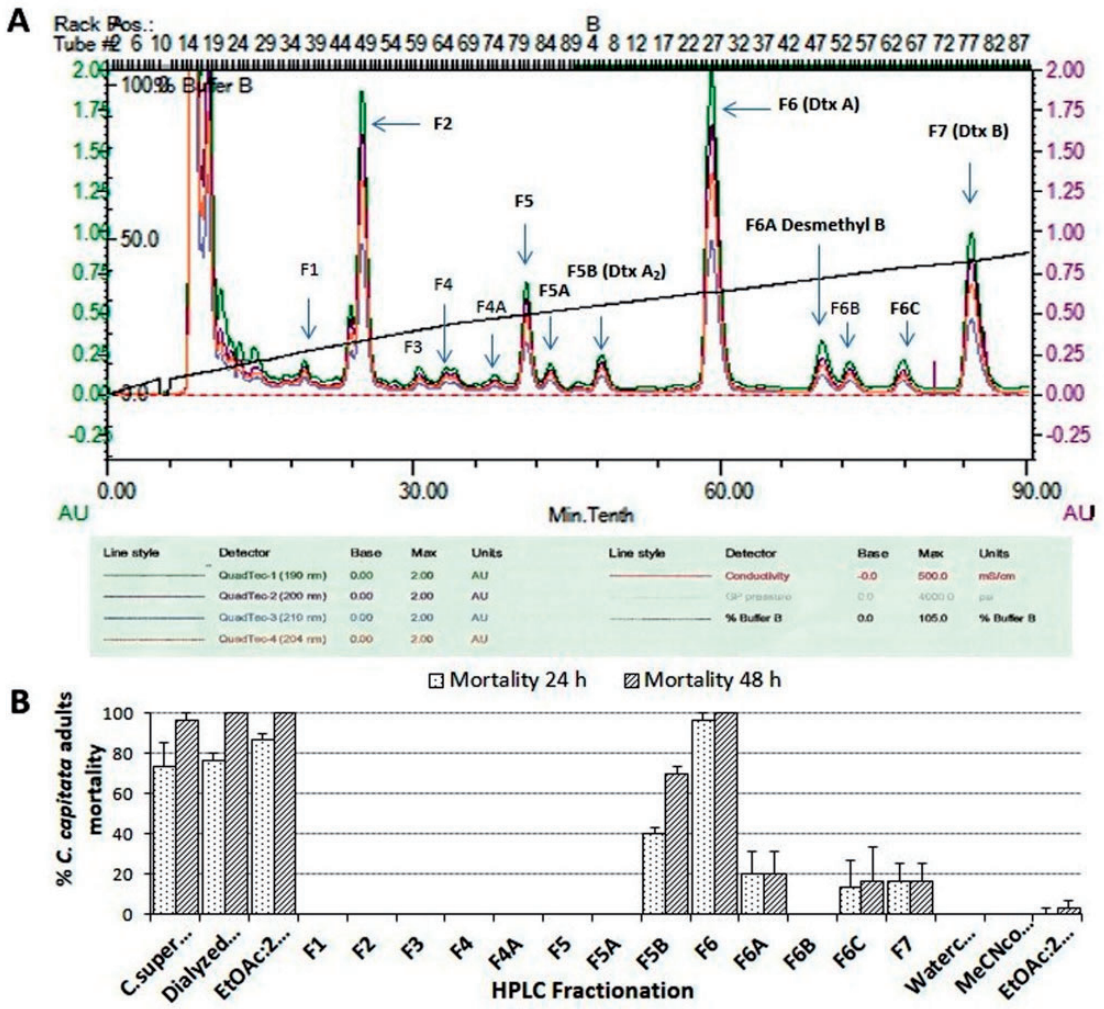
The dtx A production for both EAMb 09/01-Su and ARSEF 23 strains was similar (830.5 and 884.5 ppm), while the dtx A<sub>2</sub> production was 21% higher in the EAMb 09/01-Su strain than in the ARSEF 23 strain

## Discussion

When investigating environmentally friendly biological pest-control methods, microorganisms act as a prominent reservoir of insecticidal compounds of natural origin. The crude extract of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su strain contained secondary metabolites, including destruxins, which have insecticide activity against *C. capitata* when administered *per os*. The entomopathogenic mitosporic ascomycete *Metarhizium* has been used worldwide for invertebrate pest control as an alternative to chemical pesticides (Milner, 2000, Lomer et al. 2001, Zimmermann 2007, Khan et al. 2012). Numerous secondary metabolites have been isolated from *Metarhizium* spp. through different methodologies and were evaluated on different insect (Pais et al. 1981; Jegorov et al. 1992, 1998; Loutelier et al. 1996; Hsiao and Ko 2001; Pedras et al. 2002; Uchida et al. 2005).

Up to now, only one study has explored the activity of dichloromethane extracts from the entomopathogenic fungi on *C. capitata* (Castillo et al. 2000). However, our paper is the first one that characterizes a *Metarhizium* crude extract and reports its activity on *C. capitata* due to dtx A and dtx A<sub>2</sub>. In our study, the insecticidal metabolites were obtained in the dialyzed fraction and exhibited high efficiency and a range of mortalities against *C. capitata*, between 93.3 and 100.0%; the metabolites corresponded to fractions <3.5 kDa. Besides, the extract of EAMb 09/01-Su





**Fig. 4.** The HPLC profile of the EtOAc:2-propanol fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and its evaluation. (A) HPLC profile; mobile phase, H<sub>2</sub>O: MeCN 80:20 (v/v) with linear gradient in 89.8 min; reverse phase C18 (10 by 10 mm by 10 μm Ascentis), flow-rate 2 mL /min., (λ)=210, 204, 200, 190 nm simultaneously. (B) Evaluation of HPLC subfractions against *C. capitata* adults.

**Table 2.** Linear regression (Log-dose)

Treatment	Probit regression	Pearson	Chi-square gl (2)	LC <sub>50</sub>	95% Fiducial limits for dose
F6 subfraction	Y = 1.373X - 2.775	0.053	5.879	104.97	0.678-2.069
Standard dtx A	Y = 2.895X - 5.90	0.230	2.94	109.11	2.017-3.773

Percentage of adults mortality treated with five doses of F6 subfraction obtained of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate with corresponding LC<sub>50</sub> on adults of *C. capitata*.

The concentrations of F6-subfraction were established taking into account the content of dtx A. The concentration of dtx A in the active fraction was determined for comparison to the standard dtx A (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) used the VARIAN 1200 LCMS. The concentrations evaluated were 25, 50, 100, 200, and 400 ppm with relation to dtx A contained in F6 subfraction.

showed insecticidal activity when adialyzed and crude protein fractions were offered, indicating that this strain is able to produce also insecticidal proteins but with less activity.

The fractionation with the silica gel column using EtOAc:2-propanol (1:9 v/v) as the eluent condition

achieved an active fraction that produced 100% mortality on *C. capitata* 48 h postfeeding. The LC-MS analysis of the active fraction of the EAMb 09/01-Su crude extract obtained using EtOAc:2-propanol (1:9 v/v) found compounds with molecular masses between 453 and 611 [M + H]<sup>+</sup>. The HPLC-mediated fractionation of

**Table 3. Acute activity of the F6 subfraction from the crude extract of the EAMb 09/01-Su strain assayed at 400 ppm dtx A against newly emerged *C. capitata* adults**

Exposure time (h)	Mortality at 0 h (± SE) (%) <sup>a</sup>	Mortality at 18 h (± SE) (%) <sup>a</sup>	Kaplan–Meier survival analysis	
			AST <sup>b</sup>	95% Confidence interval
1	23.3 ± 3.3b	70.0 ± 5.7b	12.7c	10.3–15.1
3	70.0 ± 11.5a	93.3 ± 3.3a	5.6b	3.0–8.1
6	86.6 ± 6.6a	100.0 ± 0.0a	2.8a	1.1–4.5
9	80.0 ± 5.7a	90.0 ± 0.0a	4.2ab	1.8–6.5
12	83.3 ± 3.3a	90.0 ± 5.7a	3.6ab	1.5–5.7
Control- water	0.0b	0.0c	18d	18.0–18.0
Control-medium	0.0b	6.6 ± 3.3c	18d	18.0–18.0

<sup>a</sup> Means in each column with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected or Tukey's HSD tests at  $P = 0.05$ . The concentration of dtx A in the active fraction was determined by comparison with the standard dtx A (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) using the VARIAN 1200 LC-MS.

<sup>b</sup> Means with the same letter are not significantly different according to a log-rank test ( $P < 0.05$ ). Average survival time (AST) limited to 18 h. Adults were fed on contaminated diet for the selected exposure times and then transferred to untreated diet.

**Table 4. Effect of temperature treatments on the insecticidal activity of the two active subfractions of the EAMb 09/01-Su crude extract against newly emerged *C. capitata* adults**

Treatment	Crude supernatant	EtOAc:2-propanol fraction	F6 subfraction	F5B subfraction
Control (25°C)	100a	96.6 ± 3.3a	96.6 ± 3.3a	80.6 ± 5.2a
60°C to 2 h	90 ± 10.0a	96.6 ± 3.3a	93.3 ± 3.3a	83.3 ± 6.7a
120°C to 20 min	90 ± 5.7a	100a	100a	53.3 ± 12.0a

Data indicate mortality at 24 h (mean ± SE).

<sup>a</sup> Means in each column with the same letter are not significantly different according to Fisher's protected or Tukey's HSD tests at  $P = 0.05$ .

**Table 5. Acute mortality percentage (mean ± SE) and AST of newly emerged *C. capitata* adults exposed to the crude supernatant of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate and the ARSEF 23 and BIPESCO5 reference strains**

Strain	Mortality <sup>a</sup> (mean ± SE) (%) <sup>a</sup>	Kaplan–Meier survival analysis	
		AST <sup>b</sup> h	95% Confidence interval
BIPESCO5	75.1 ± 5.9b	22.3b	20.4–24.1
EAMb 09/01-Su	96.6 ± 3.3a	16.2c	12.9–19.4
ARSEF 23	93.0 ± 3.5ab	15.3c	11.9–18.6
Control	3.3 ± 3.3c	24.0a	24.0–24.0

<sup>a</sup> In each column, mean values with the same letter are not significantly different according to Fisher's protected or Tukey's HSD test at  $P = 0.05$ .

<sup>b</sup> Means with the same letter are not significantly different according to a log-rank test ( $P < 0.05$ ). Average survival time (AST) was limited to 24 h. The crude supernatant was concentrated 10 times their initial volume.

**Table 6. Linear regression (Log-time), lethal time and AST of newly emerged *C. capitata* adults exposed to the active F6 subfraction of both the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate, ARSEF 23 reference strain, and standard dtx A**

Treatment	Linear regression	LT <sup>50</sup> h	Kaplan–Meier survival analysis	
			AST* (h)	95% Confidence interval
F6 subfraction EAMb 09/01-Su	$Y = 2.35X - 1.458 \text{ g}(2)$ ; chi-square = 3.161	4.13	7.7a	5.5–9.8
F6 subfraction ARSEF 23	$Y = 3.98X - 2.888 \text{ g}(2)$ ; chi-square = 1.584	5.29	9.2a	7.0–11.4
Standard dtx A	$Y = 1.73X - 1.272 \text{ g}(2)$ ; chi-square = 0.949	5.46	10.4a	7.8–13.0

The concentration of dtx A in the active fractions (400 ppm) was determined by comparison with the dtx A standard (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) using the VARIAN 1200 LCMS.

\*Means with the same letter are not significantly different according to a log-rank test ( $P < 0.05$ ). Average survival time (AST) was limited to 18 h.

the active fraction using a linear gradient of H<sub>2</sub>O/MeCN (80/20) to 100% MeCN showed the highest number of compounds, 13 of which were related to destruxins.

The ranges of dtx A contained in crude supernatant, in the dialyzed fraction, and in the F6 subfraction were similar with 631.35, 660.96, and 505.92 ppm (µg dtx A/ml), respectively, demonstrating high efficiency in

the process of extraction. Our results are comparable with the methodology used by Liu et al. (2005), who found that the MeCN/H<sub>2</sub>O ratio in the gradient elution buffer of the semipreparative HPLC yielded high extraction efficiency of destruxins.

The insecticidal test of the F6 and F5B subfractions resulting from the HPLC profile chromatogram

showed mortalities of *C. capitata* at 100 and 70% 48 h postfeeding, respectively. The toxicity test against *C. capitata* adults showed that the highly toxic compounds of the EAMb 09/01-Su crude extract were contained in these two subfractions. According to the mass analysis, these compounds were related to dtx A and A<sub>2</sub>; therefore, *C. capitata* adults were found to be highly susceptible to these two destruxins. These results are consistent with other research on the insecticidal properties of destruxins; dtx A has been referenced as an insecticide for several insect species, such as *Spodoptera litura* (F.), with a mortality of 65% at 96 h with 300 ppm (Hu et al., 2007). The injection of dtx A into *Drosophila melanogaster* Meigen adults yielded an LC<sub>50</sub> of 0.11 mM (Ruiz-Sánchez and O'Donnell 2012) and suppressed the innate immune response (Pal et al. 2007). Furthermore, *Plutella xylostella* (L.) and *Phaedon cochleariae* (F.) larvae were highly susceptible to dtx A, with LC<sub>50</sub> values of 30 and 17 ppm, respectively (Amiri et al. 1999). The dtxs A and A<sub>2</sub> have been shown to be toxic against *Schistocerca gregaria* (Forsskål) as well (James et al. 1993).

In this study, we investigated further into the biological activity of F6 subfraction against *C. capitata* adults. The results showed that mortality was dose-related when exposed to treated diet. The LC<sub>50</sub> was 104.92 ppm, and the LT<sub>50</sub> was 4.16 h with a 400 ppm concentration of dtx A in F6-subfraction. At this concentration, chronic mortality reached 70% at 18 h post-feeding with only 1 h of exposure and an AST of 12.6 h. When *C. capitata* adults were exposed for 6 h to the treated diet, the AST was reduced to 2.8 h. The relevance of this finding lies in that the major obstacle of the commercial aspect limiting the marketing of fungi as mycoinsecticides is their slow killing speed (Leger and Wang 2009, Khan et al. 2012). However, the development of biopesticides through the obtaining of secondary metabolites of entomopathogenic fungi is a potential opportunity to protect agricultural crops against insect pests by their rapid action against target organisms. On the other hand, several fungi have been reported to show endophytic behavior after their application on plants (Vega et al. 2008, Tefera and Vidal 2009), but the fate of the secreted metabolites in the plant is still unknown. Therefore, it is possible that insects can acquire these compounds by their feeding, and reduce their lethal time.

A second important result is the demonstrated stability of the active fractions under high temperatures; the insecticidal capacity remained >90% when fractions were treated at 60°C for 2 h and 120°C for 20 min. Tolerance to adverse environmental factors is an important characteristic to consider when establishing biological strategies in the field. This issue acquires further significance in certain ecosystems, in particular those in the heatstroke conditions prevailing for a long periods, such as Mediterranean ecosystems where *C. capitata* is key pest (Yousef et al. 2014). The crude extract of this fungal strain suggested their potential use as a bait spray or even a new "lure and kill" *C. capitata* control strategy (Yousef et al. 2014). The stability to high temperature in these new purification steps reinforces the

previous idea of using EAMb 09/01-Su extract in field under Mediterranean conditions.

When comparing the insecticidal activity of the F6 subfraction of the EAMb 09/01-Su crude extract with the F6 subfraction of the ARSEF 23 crude extract (reference strain), results were similar, with mortality values of 90.0 and 97.0%, respectively. However, the AST of the flies exposed to the F6 subfraction of the EAMb 09/01-Su crude extract was shorter (7.7 h) than that of the ARSEF 23 crude extract (9.2 h). The dtx A production was similar for both strains, but dtx A<sub>2</sub> production was higher for the EAMb 09/01-Su crude extract than for the ARSEF 23 crude extract.

The results of this research together with other previous investigations of the *M. brunneum* EAMb 09/01-Su isolate that showed 100% *C. capitata* mortality with LC<sub>50</sub> of  $2.84 \times 10^7$  conidia/ml and LT<sub>50</sub> of 5.6 d, additive effect with its crude extract, and stability to environmental conditions (i.e., ultraviolet B radiation; Yousef et al. 2013, Resquin-Romero et al. 2012, Lozano-Tovar et al. 2012) demonstrate the potential of this strain for the biological control of insects. With this strain, it is possible to generate a product with highly sought-after features, such as rapid action against target organisms and stability under adverse environmental conditions (field and storage).

### Acknowledgments

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation Project AGL2011-27646. We thank Sandra M<sup>a</sup> Castuera Santacruz and Carlos Campos Porcuna for their excellent technical assistance, and Dr. Hermann Strasser (Institute of Microbiology, University of Innsbruck, Austria) and Dr. Richard Humber (U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Services [USDA-ARS], Robert W. Holley Center Ithaca) for kindly providing BIPESCO5 (*Metarhizium brunneum*) and ARSEF 23 (*Metarhizium robertsii*) reference strains used in this investigation.

### References Cited

- Alaoui, A., A. Imoulan, Z. El Alaoui-Talibi, and A. El Meziane. 2010. Genetic structure of mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations from moroccan endemic forest of *Argania spinosa*. Inter. J. Agric. Biol. 12: 291-298.
- Albajes, R., and C. Santiago-Alvarez. 1980. Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Ceratitis capitata* (Wied). An. INIA. Ser. Agric. 13: 183-190.
- Amiri-Besheli, B., L. Ibrahim, and T. Butt. 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pest. Biocontrol Sci. Technol. 9: 487-498.
- Amiri-Besheli, B., B. Khambay, S. Cameron, M. L. Deadman, and T. M. Butt. 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. Mycol. Res. 104: 447-452.
- Azumi, M., K. Ishidoh, H. Kinoshita, T. Nihira, F. Ihara, T. Fujita, and Y. Igarashi. 2008. Aurovertins F-H from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Nat. Prod. 71: 278-280.
- Ballard, C., H. Yu, and B. Wang. 2002. Recent development in decapeptide. Curr. Med. Chem. 9: 471.

- Boss, D., M. Maurhofer, E. Schaläpfer, and G. Defago. 2007.** Elsinochrome A production by the bindweed biocontrol fungus *Stagonospora convolvuli* LA 39 does not pose a risk to the environment or the consumer of treated crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 194–205.
- Carollo, C., A. Calil, L. Schiave, T. Guaratini, D. Roberts, and N. Lopes. 2010.** Fungal tyrosine betaine, a novel secondary metabolite from conidia of entomopathogenic *Metarhizium* spp. fungi. *Fungal Biol.* 114: 473–480.
- Castillo, M., P. Moya, E. Hernández, and E. Yufera. 2000.** Susceptibility of *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Diptera Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Control* 19: 274–282.
- Chueca, P., C., Garcera, A., Urbaneja, E., Molto, 2013.** A new mechanised cultural practice to reduce *Ceratitidis capitata* wied populations in area-wide IPM. *Span. J. Agric. Res.* 11: 1129–1136.
- Chun-Chi, W., Ch. Tzu-Hsiu, L. Bing-Lan, W. Li-Chen, Ch. Yung-Ching, T. Yew-Min, and H. Shih-Lan. 2013.** Destruxin B isolated from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* induces apoptosis via a Bcl-2 Family-dependent mitochondrial pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013: Article ID 548929.
- De Villiers, M., A. Manrakhan, P. Addison, and V. Hattingh. 2013.** The distribution, relative abundance, and seasonal phenology of *Ceratitidis capitata*, *Ceratitidis rosa*, and *Ceratitidis cosyra* (Diptera: Tephritidae) in South Africa. *V. Environ. Entomol.* 42: 831–840.
- Dimbi, S., N. Maniania, and S. Ekesi. 2009.** Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitidis capitata*, *Ceratitidis cosyra* and *Ceratitidis fasciventris*. *Biol. Control* 50: 111–116.
- Fujii, Y., H. Tani, M. Ichinoe, and H. Nakajima. 2000.** Zygospore D and two new cytochalasins produced by the fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Nat. Prod.* 63: 132–135.
- Garrido-Jurado, I., F. Ruano, M. Campos, and E. Quesada-Moraga. 2011.** Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biol. Control.* 59: 239–244.
- Goncalves, R. S., D. E. Nava, H. C. Pereira, H. Lisboa, A. D. Gruetzmacher, and R. A. Valgas, 2013.** Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106: 791–798.
- Haniotakis, G. 2005.** Olive pest control: Present status and prospects. *IOBC/WPRS Bulletin* 28, 1–9.
- Hsiao, Y., and J. Kob. 2001.** Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* 39: 837–841.
- Hu, Q., S. Ren, S. An, and M. Qian. 2007.** Insecticidal activity influence of destruxins on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura*. *J. Appl. Entomol.* 131: 262–268.
- Hu, Q., S. Ren, J. Wu, J. Chang, and P. Musa. 2006.** Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon* 48: 491–498.
- Imoulan, A., A. Alaoui, and A. Meziane. 2011.** Natural occurrence of soil borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitidis capitata*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 2619–2628.
- James, P., M. Kershaw, S. Reynolds, and A. Charmley. 1993.** Inhibition of desert locust (*Schistocerca gregaria*) Malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Insect Physiol.* 39: 797–804.
- Jegorov, A., P. Sedmera, V. Havliac, and V. Matha, 1998.** Destruxin ed1 a cyclopeptide from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 49: 1815–1817.
- Jegorov, A., M. Vladimir, P. Sedmera, and D. Roberts. 1992.** Dihydrodestrux A a natural destruxin from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 31: 2669–2670.
- Khan, S., L. Guo, Y. Maimaiti, M. Mijit, and D. Qiu. 2012.** Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Mol. Plant Breed* 3: 63–79.
- Konstantopoulou, M., P. Milonas, and B. Mazomenos. 2006.** Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 1657–1664.
- Krasnoff, S. B., C. H. Sommers, Y. S. Moon, B. G. Donzelli, J. D. Vandenberg, A. C. Churchill, and D. M. Gibson. 2006.** Production of mutagenic metabolites by *Metarhizium anisopliae*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7083–7088.
- Lee, Y., C. Wang, and W. Liao. 2012.** *In vitro* and *in vivo* anti-cancer effects of destruxin B on human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 32: 2735–2745.
- Leger, R., and C. Wang 2009.** Entomopathogenic fungi and the genomic era, (pp. 366–400). In S. P. Stock, J. Vandenberg, I. Glazer, and N. Boemare (eds.), *Insect pathogens: Molecular approaches and techniques*. CABI, Wallingford, United Kingdom.
- Liu, B., and Y. Tzeng. 2012.** Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 1242–1254.
- Liu, C. H., S. Huang, and Y. Tzeng. 2005.** Purification and quantitative analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27: 1013–1025.
- Lomer, C. J., R. P. Batema, D. L. Johnson, J. Lagewald, and M. Thomas. 2001.** Biological control of locusts and grasshopper. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 667–702.
- Loutelier, C., J. Cherton, C. Lange, M. Traris, and A. Vey. 1996.** Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae*: Direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. *J. Chromatogr. A* 738: 181–189.
- Lozano-Tovar, M. D., I. Garrido-Jurado, and E. Quesada-Moraga. 2012.** Potential of secondary metabolites secreted by the entomopathogenic mitosporic ascomycetes *Beauveria* sp. and *Metarhizium* spp. for medfly *Ceratitidis capitata* adult control. In International citrus congress. Valencia, Spain.
- Lozano-Tovar M. D., A. Ortiz-Urquiza, I. Garrido-Jurado, A. Trapero-Casas, and E. Quesada-Moraga. 2013.** Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biol. Control* 67: 409–420.
- Maddison, P. A., and B. J. Bartlett, 1989.** Contribution towards the zoogeography of the tephritidae, (pp. 27–35). In A. S. Robinson, and S. Hooper. (eds.), *Fruit flies their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam.
- Magaña, C., P. Hernández-Crespo, F. Ortego, and P. Castañera. 2007.** Resistance to Malathion in Field Populations of *Ceratitidis capitata*. *J. Econ. Entomol.* 100: 1836–1843.
- Milner, R. 2000.** Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol N. Inform* 21: 47N–50N.
- Moon, Y., B. Donzelli, S. Krasnoff, H. McLane, M. Griggs, P. Cooke, J. Vandenberg, D. Gibson, and A. Churchill. 2008.** Agrobacterium-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen

- Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. Appl. Environ. Microb. 74: 4366–4380.
- Ortiz-Urquiza, A., L. Garrido-Jurado, C. Santiago-Álvarez, and E. Quesada-Moraga. 2009.** Purification and characterization of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pest Manage. Sci. 65: 1130–1139.
- Ortiz-Urquiza, A., L. Riveiro-Miranda, C. Santiago-Álvarez, and E. Quesada-Moraga. 2010.** Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 105: 270–278.
- Pais, M., B. Das, and P. Ferron. 1981.** Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. Phytochemistry 20: 715–723.
- Pal, S., R. Leger, and L. Wu. 2007.** Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 282: 8969–8977.
- Pedras, M., L. I. Zaharia, and D. Ward. 2002.** The destruxins: Synthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochemistry 59: 579–796.
- Peng, K., H. Huang, Y. Tzeng, and S. Liu. 2005.** Circular dichroism analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae*. J. Biochem. Biophys. Methods 62: 41–50.
- Quesada-Moraga, E., I. Martín-Carballo, I. Garrido-Jurado, and C. Santiago-Álvarez. 2008.** Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biol Control 47: 115–124.
- Quesada-Moraga, E., A. Ruiz-García, and C. Alvarez-Santiago. 2006.** Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 99: 1955–1966.
- Resquin-Romero, G., I. Garrido-Jurado, and E. Quesada-Moraga. 2012.** Selection of entomopathogenic fungi Isolates (Ascomycota: Hypocreales) for the control of the cotton leaf-worm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) based on their virulence and activity of their extracts. Cordoba Univ. 49.
- Ruiz-Sánchez, E., and M. O'Donnell. 2012.** Effects of the microbial metabolite destruxin A on ion transport by the gut and renal epithelia of *Drosophila melanogaster*. Arch. Insect Biochem 80: 109–122.
- Rull, J., N. Encarnación, and A. Birke. 2012.** Mass rearing history and irradiation affect mating performance of the male fruitfly, *Anastrepha obliqua*. J. Insect Sci. 12: 45.
- Sarabia, F., S. Chammaa, A. Sanchez, L. Martín, and F. Lopez. 2004.** Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. Curr. Med. Chem. 11: 1309–1332.
- Skropek, A., and T. M. Butt. 2005.** Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 251: 23–28.
- Skropek, A., F. A. Shah, and T. M. Butt. 2008.** Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. BioControl 53: 361–373.
- Steck, G. J. 2001.** Concerning the occurrence of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in Florida. Fla. Entomol. 84: 320–321.
- Tefera, T., and S. Vidal. 2009.** Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. BioControl 54: 663–669.
- Uchida, R., R. Imasato, Y. Yamaguchi, R. Masuma, J. Shiomi, H. Tomoda, and S. Omura. 2005.** New insecticidal antibiotics, hydroxyfngerins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. J. Antibiotics. 58: 804–809.
- Vega, F. E., F. Posada, M. Catherine Aime, M. Pava-Ripoll, F. Infante, and S. A. Rehner. 2008.** Entomopathogenic fungal endophytes. Biol. Control 46: 72–82.
- Wang, B., Q. Kang, Y. Lu, L. Bai, and C. Wang. 2012.** Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 1287–1292.
- Yousef, M., I. Garrido-Jurado, and E. Quesada-Moraga. 2014.** One *Metarhizium brunneum* strain, two uses to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 107: 1736–1744.
- Yousef, M., M. D. Lozano-Tovar, I. Garrido-Jurado, and E. Quesada-Moraga. 2013.** Biocontrol of *Bactrocera Oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. J. Econ. Entomol. 106: 1118–1125.
- Zimmermann, G. 2007.** Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Sci. Technol. 17: 879–920.

Received 30 October 2014; accepted 21 January 2015.

### **3. *Metarhizium brunneum* AND *Beauveria bassiana* RELEASE SECONDARY METABOLITES WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *Verticillium dahliae* AND *Phytophthora Megasperma* OLIVE PATHOGENS.**

Con este trabajo se abordó el cuarto objetivo y se logró determinar el efecto fungicida de la fracciones orgánicas obtenidas de hongos entomopatógenos sobre *V. dahliae* y *P. megasperma*. Los resultados indican que los hongos entomopatógenos evaluados tienen la capacidad de producir compuestos que inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma in vitro* y redujeron los síntomas de la Verticilosis en plantas bajo condiciones controladas; además se pudo demostrar el efecto negativo de los extractos y fracciones parcialmente puras sobre la germinación y producción de microesclerocios de *V. dahliae* y propágulos de *Phytophthora* spp.

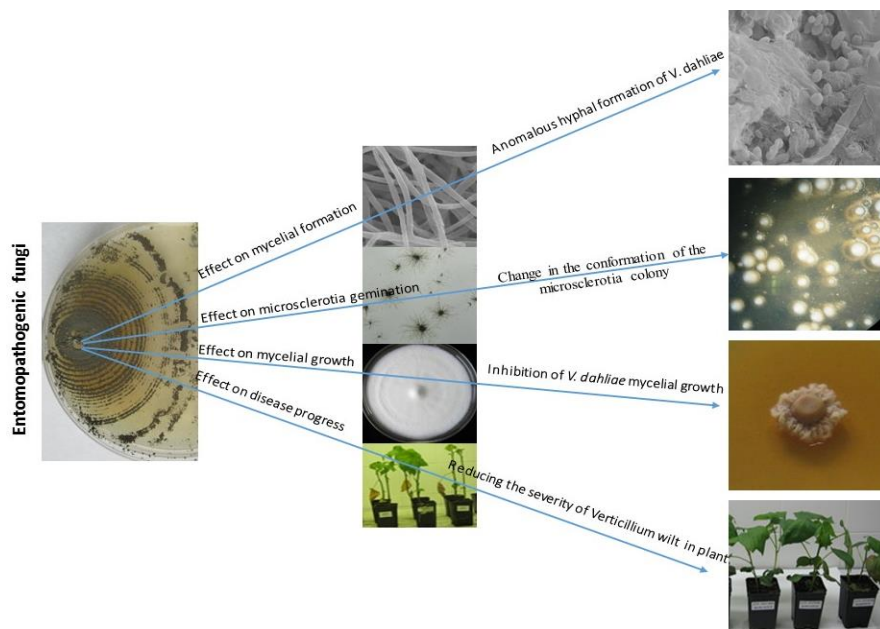
Artículo en proceso de publicación.

# *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens

M.D. Lozano-Tovar<sup>a,b</sup>, M.C. Raya-Ortega<sup>a</sup>, I. Garrido-Jurado<sup>b</sup>, E. Quesada-Moraga<sup>b</sup>, A. Trapero-Casas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Agroforestry Pathology, Department of Agronomy, ETSIAM, University of Cordoba, Campus of Rabanales, Edificio C4, 14071 Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Agricultural Entomology, Department of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio C4, 14071 Cordoba, Spain



## Highlights

- *Beauveria* spp and *Metarhizium* spp have shown potential control against olive pathogens.
- The active metabolite obtained from *M. brunneum* reduces the reproductive structures of *V. dahliae*.
- *M. brunneum* produces antifungal compounds that reduce the severity of Verticillium wilt.
- *M. brunneum* can be an alternative for the integrated management of Verticillium wilt and Phytophthora root rot in the olive orchards.

## Abstract

The antifungal activity of the entomopathogenic fungi isolates *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su and *Beauveria bassiana* EABb 09/16-Su against the olive pathogens *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* was studied. The crude extract, the dialyzed, aqueous chloroform, and the methanol fractions obtained from both isolates showed 100% inhibition of the mycelial growth of *V. dahliae* V117. However, the same fractions obtained from *B. bassiana* EABb 09/16-Su were less efficient against the mycelial growth of *P. megasperma*. Our results showed that *M. brunneum* EAMb 09/01 Su had the highest effective fungicidal activity, inhibiting the mycelial growth of both pathogens (100%). Both the methanol and H<sub>2</sub>O-MeOH fractions from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su were evaluated by the progress of the Verticillium wilt of the plant and showed clear antagonism against *V. dahliae*, reducing the severity of the symptoms between 38.9 and 58.9%. The active metabolite obtained from *M. brunneum* not only reduced the germination of *V. dahliae* microsclerotia but also inhibited hyphal formation, decreased the number of reproductive structures and changed the conformation of the microsclerotial colony, preventing the formation of new microsclerotia. The evaluation of (temperature, UV light and pH on the antifungal activity of the dialyzed fraction from *M. brunneum* showed that the activity was stable at 60°C (2 h) and 120°C (20 min) and to UV light at exposure times of 2, 4, and 6 h. However, exposure to the dialyzed fraction at pH 7.5 and 8.5 for 24 h affected the antifungal activity. The results of this study clearly showed that the entomopathogenic fungus *M. brunneum* EAMb 09/01-Su produces antifungal compounds that reduce the pathogen propagules in the soil and the severity of Verticillium wilt. Therefore, this resource should be further studied as an alternative for the integrated management of Verticillium wilt and Phytophthora root rot, which is the most severe disease in all traditional olive-growing regions worldwide, and as a reliable and sustainable strategy for a reduced reliance on pesticides.

**Key word:** Fungal extracts, Verticillium wilt, antagonism microorganism, Phytophthora root rot, antifungal activities.

### ***1. Introduction***

The olive crop has huge economic, social and ecological importance in the Mediterranean Basin. The olive cultivation in the Mediterranean Basin comprises 97% of the worldwide olive



cultivation, however, the net production has greatly decreased because of losses caused by *Verticillium* wilt (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

*Verticillium dahliae* Kleb is a soil-borne fungal plant pathogen responsible for *Verticillium* wilt, which affects a broad range of herbaceous and woody hosts including crops, flowers, and vegetables that are important economically, causing great economic losses every year (López-Escudero et al., 2004, Jiménez-Díaz et al., 2012). Several characteristics of the pathogen make *Verticillium* wilt control difficult. The pathogen can survive for long periods in soil and produces resting structures, known as microsclerotia, in the senescent tissues of affected plants. The microsclerotia are the fungal spreading structures and the principal dissemination method of inocula in the field (López-Escudero et al., 2007, Morales-Lizcano and Dobinson, 2013). The growth cycle of *V. dahliae* includes three vegetative phases: parasitic, saprophytic and dormant. *V. dahliae* forms microsclerotia in the dormant stage (Xiong et al., 2013). A characteristic feature of *Verticillium* wilt is containment in the xylem vessels of the host plants. *V. dahliae* enters into the plant either via hyphal growth or by uptake of the phialoconidia or blastoconidia through broken roots or punctured stems. Colonization follows gradually, radially and basipetally, or rapidly in xylem elements and basipetally by spores with periodic sporulation cycles (Pegg and Brady, 2002, Fradin and Thomma, 2006). Studies have shown that the infection of roots by *V. dahliae* occurs in the root cap and in the zone of elongation. Penetration is both inter- and intracellular, with impedance of the hyphae invading the endodermis (Pegg and Brady, 2002, Fradin and Thomma, 2006). The ability of *V. dahliae* to survive in the soil for long periods with or without a host plant and the colonization of the water-conducting tissues within a plant limit strategies to eradicate the pathogen. *Verticillium* wilt is prevalent in olive orchards and causes significant yield losses. The highly virulent defoliant and non-defoliating *V. dahliae* pathotypes occur principally in southern Spain (Lopez-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

*Phytophthora megasperma* Drechsler, another important olive pathogen, has been associated with the death of young olive trees in Spain (Sánchez-Hernandez et al., 1998). The disease (root rot and stem rot) has been reported in some crops (Faris and Sabo, 1981) and often occurs in poorly drained soils. Often, the damage is confined to small areas, but in some cases entire fields are

severely affected. The primary and secondary roots of infected plants are characterized by yellowish- or reddish-brown to dark brown lesions, often with yellow margins. Infected young trees can die rapidly in waterlogged soils. Sánchez-Hernandez et al. (2001) demonstrated that *P. megasperma* causes the “Drying syndrome” in new plantations in southern Spain. In the same way Kouyeas and Chitzanidis (1968) described *P. megasperma* isolated from roots of olive trees in Greece, and Teviotdale (1994) linked crown rot of olive trees with several species of *Phytophthora* in California.

These two pathogens have become a major problem in olive crops over the last few decades (Sánchez-Hernandez et al., 2001, López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011). While several fungicides have been tested for application directly on plants, none have been found suitable for continual use (Dutta, 1980, López-Escudero et al., 2004). Public concern about pesticides and food security is encouraging the exploration of alternative methods for olive crops (Wang et al., 2013). Management strategies are focused on preventive measures, including the use of resistant cultivars, soil fumigation and biological control treatments. Microorganisms such as viruses, bacteria and fungi are mainly employed for biological control. Microorganisms are considered as miniature chemical factories that produce bioactive compounds, which have an incredible array of chemical structures and versatile biological activities (Donadio et al., 2002, Knight et al., 2003, Bérdy, 2005). Secondary metabolites play an important role in the control of plant pathogens.

The entomopathogenic fungi have been employed against insect pests because they efficiently kill insects, are persistent in the field and are considered relatively safe for the environment and human health (Boss et al., 2007, Garrido-Jurado et al., 2011). The entomopathogenic fungi produce enzymes and metabolites that participate in the infection process, such as cyclic depsipeptides (Vey et al., 2001). These enzymes degrade the insect cuticle but also affect fungal cell walls in the same manner as the antagonistic microorganisms used as fungicides (Gohel et al., 2006, Shubakov and Kucheryavykh, 2004, Molnár et al., 2010, Wang et al., 2013). Many secondary metabolites from the entomopathogenic fungi have *in vitro* antimicrobial activities against a wide variety of microorganisms. These can also be used by entomopathogens to overcome host defenses and ultimately kill the host and to defend host resources against competing pathogens and saprophytes (Molnár et al., 2010).

Secondary metabolites of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin are reported to have antifungal and antibacterial activity against some pathogens (Parine et al., 2010, Sahab 2012, Lozano-Tovar et al., 2013). In contrast, *Metarhizium* species have been considered as linked to the rhizosphere (Hu and Leger, 2002, Leger et al., 2011). Differential expression of two adhesion genes, MAD1 and MAD2, was found in *Metarhizium*-exposed root exudates. MAD1 was related to the adhesion of *Metarhizium* to insect cuticles, while MAD2 has been linked to adhesion to plants (Wang and Leger, 2007). Investigations have demonstrated that this fungus can colonize internal tissues and has potential as a plant growth promoter. Sasan and Bidochka (2012) showed that *Panicum virgatum* and *Phaseolus vulgaris* plants colonized endophytically by *Metarhizium robertsii* grew faster and had greater root hair density than controls. Similar results were obtained by Kabaluk and Ericsson (2007), in which *Zea mays* seeds treated with *Metarhizium anisopliae* showed a significant increase in stand density, the fresh weight of the foliage area, and yield. Some *M. anisopliae* isolates exhibited clear antagonism against *Ceratocystis ulmi* isolates (Gemma et al., 1984), or against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani* (Kang et al., 1996). However, Yong-Xia et al. (2010) demonstrated the inhibition of *M. anisopliae* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, the pathogen of cotton wilt. Other work has showed that a crude metabolite obtained from *M. anisopliae* (TK09) showed the highest inhibitory activity against *Cladosporium herbarum* and lowest to *F. oxysporum* (Ravindran et al., 2014). Studies with crude extracts of *Beauveria* and *Metarhizium* on *V. dahliae* showed a 96 and 100% of inhibition of conidia germination, respectively, as well 58.6 and 96.3% inhibition of microsclerotia colonial formation (Lozano-Tovar et al., 2013). These results indicate the importance of screening studies.

This paper shows the antagonistic activity of organic fractions of *Metarhizium brunneum* Petch EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su *in vitro* against *V. dahliae* and *P. megasperma* and the effect of these fractions on the reduction of Verticillium wilt *in vivo*. Our results indicate that the secondary metabolites released by entomopathogenic *M. brunneum* EAMb 09/01-Su could have biocontrol potential for the olive pathogens *V. dahliae* and *P. megasperma* and be a reliable and sustainable strategy for the notable suppression of Verticillium wilt. This approach

should be further studied and transferred to integrated pest management for the commercial plant protection of olive orchards with reduced reliance on pesticides.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Fungal isolates**

Two indigenous strains of entomopathogenic fungi, *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su from the culture collection at the Department of Agricultural and Forestry Sciences and Resources (AFSR) of the University of Córdoba (Spain), and three isolates of soil-borne fungal plant pathogens (V117, V004 and P020) were used in this study. The plant pathogens *V. dahliae* and *P. megasperma* were obtained from the collection of the Laboratory of Plant Pathology at the Department of Agronomy, University of Córdoba. The two *V. dahliae* isolates are representative of the defoliating (V117) and non-defoliating (V004) pathotypes that cause Verticillium wilt in southern Spain (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011; Jiménez Diaz et al., 2012), while *P. megasperma* (PO20) is representative of the main species causing phytophthora root rot in southern Spain (Sánchez-Hernández et al., 2001).

### **2.2. Evaluation of crude extracts and their organic fractions against *V. dahliae* and *P. megasperma***

The crude extracts of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su were chemically fractionated (Konstantopoulou et al., 2006). The fungal extract of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su was produced in G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> medium [40 g D (+)-glucose anhydrous (Pancreac E.U) and 20 g peptone (Microkit, S.L. Madrid Spain) per liter, pH 5.22±0.2] as previously described by Ortiz-Urquiza et al. (2010) with some modifications. Briefly, a primary culture inoculated with 10<sup>7</sup> conidia/ml was cultivated on a rotary shaker at 110 rpm for 4 days at 25 ± 0.5°C. Then, 2 ml of the primary culture was transferred to a 1 L flask containing 250 ml of liquid medium. This secondary culture was cultivated for 15 days under the former conditions. The cells were filtered through Whatman paper No.3 (Sigma-Aldrich Quimica SL Madrid, Spain) and centrifuged at 9000 rpm for 15 min; then, the supernatant was concentrated in a vertical flow

chamber at 28°C for 24 h. The final concentration of the extracts were standardized to ten times their volume

The concentrated supernatant was treated with chloroform (1:1) to extract the lipid fraction. The extraction was repeated twice, yielding two fractions (a chloroform layer and an aqueous chloroform layer). The chloroform layer was concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator Heidolph (Hei-VAP Advantage Schwabach, Germany) at 39°C, and the aqueous chloroform layer was evaporated in a vertical flow chamber at 28°C, then resuspended in water and mixed with methanol (1:1). The sample was subsequently placed at -20°C for 24 h, and proteins and other compounds were precipitated. The methanol layer was filtered at 4°C, yielding two fractions (a precipitate layer and a methanol layer) which were then dried in a constant flow chamber at 28°C. The fractions were sterilized by filtration through 0.20 µm filters and added to PDA culture to obtain a final concentration of 25.0% (fraction to assess). This concentration was then dispensed onto 60 mm diameter Petri plates (10 ml/plate), and agar slices (1 mm) were taken from actively growing cultures of *V. dahliae* and *P. megasperma* (the colonies were grown for 7 days) and placed in the center of Petri plates. Two controls were established: PDA culture medium and G40P20 culture medium treated with similar fractionation conditions as crude extracts, and each fraction obtained from the G40P20 culture medium was used as a control. The plates were incubated at 22±2°C, 216 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fluorescent light and a photoperiod of 12 h. The treatments (crude extract, aqueous chloroform layer, chloroform layer, methanol layer, methanol precipitate, water control, culture medium control, aqueous chloroform control, chloroform control, methanol control and methanol precipitate control) were arranged in a randomized design, with three replications for each fraction and isolate. The variable evaluated was the percentage of inhibition of mycelial growth (IMG), and the time that the colonies in the control treatment reached the edge of the plate was determined by measuring the diameter of the colonies in each treatment using a digital caliper as follows: [IMG = 100 × (colony diameter in the control – colony diameter in the treatment) / colony diameter in the control].

#### **2.4. Partial purification of metabolites with antifungal activity obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and their effectiveness against *V. dahliae***

For the partial purification of metabolites, a crude extract of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su was dialyzed as previously described (Lozano-Tovar et al., 2013). Two ml of the dialyzed fraction were subjected to a silica gel column (48 x 1.5 cm, Silica gel 60 Merck, Germany) using a two-solvent system: EtOAc:2-propanol 1:9 v/v 100% as the first solvent followed by H<sub>2</sub>O:MeOH 7:3 v/v 100% as the second solvent, at a flow rate 0.7 ml/ min; 100 ml of each solvent were used. Each eluate was collected, and the solvent was evaporated, re-suspended in distilled water, and filtered through a 0.20 µm filter. The fractions obtained were evaluated for fungicidal activity on *V. dahliae* *in vitro*. For the fungicidal activity test, potato dextrose agar (PDA) plates were spread with 200 µl of conidial suspension with 10<sup>6</sup> conidia/ml of *V. dahliae*, then holes were made in the center of plate with perforating punches, and 50 µl of each filtered fraction was applied at the perforation site and incubated as mentioned above. Negative controls were established as water and G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium, both mixed with ethyl-Isopropanol (1:9) 1:1 (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Spain). The eluents were evaporated and re-suspended in water, and 50 µl of these controls were applied. The crude extract and the dialyzed fraction were used as positive controls. The fractions were arranged in a randomized design. Three replicates were used for each fraction, and the zones of inhibition were recorded in millimeters.

The semi-pure H<sub>2</sub>O-MeOH fraction obtained by column chromatography was then evaluated against microsclerotia germination of *V. dahliae* in naturally and artificially infected soil. The naturally infected soil was obtained from a cotton crop (Villanueva de la Reina, Jaen Spain). The soil was dried with a continuous airflow for 5 days at 28°C and sieved through a 0.8 micron sieve. Then, 40 g of natural soil was saturated with the dialyzed and H<sub>2</sub>O-MeOH fractions. For the artificially infected soil, sterilized peat was inoculated with 10% microsclerotia dry inoculum produced in CSW medium as described above, and then 40 g of artificially infected soil were saturated with the dialyzed fraction and H<sub>2</sub>O-MeOH fraction. The treatments were incubated at 22±2°C for 48 h and arranged in a randomized design with three replications. A subsample of 10 grams for each repetition was suspended in 100 ml of distilled water and stirred for 1 h to 250 rpm in a rotary shaker (CFL

1092). The soil suspension was sieved through two sieves in tandem of 150 and 35  $\mu\text{m}$ . The residue retained on 35  $\mu\text{m}$  sieves was re-suspended in 100 ml distilled water and aliquots of 1 ml were spread onto a Modified Sodium Polypectate Agar (MSPA) medium plate (5 plates/replication). The MSPA plates were incubated during 14 d at  $22\pm 0.5^\circ\text{C}$  in the darkness (López-Escudero et al., 2003). The germinated microsclerotia were quantified under a stereomicroscope (Nikon SMZ-2T).

### **2.5. Standardization of soil infestation with inoculum of *Verticillium dahliae***

To evaluate the metabolite fractions in plants, the soil infestation process was standardized to produce reproducible *Verticillium* wilt disease symptoms in plants under controlled conditions. *V. dahliae* inocula (V004 and V117) were evaluated at different concentrations (0.3 and 5.0% w/w for V117 and 0.3, 3.0, 5.0 and 15.0% w/w for V004) and two environmental conditions (growth chamber and greenhouse). The inocula were prepared in a medium containing corn meal, sand and water (CSW) in a ratio of 1:9:2 (w:w:w), respectively (Trapero and Jiménez, 1985). The sand was sieved through a 2 mm sieve and dried in an oven for 48 h at  $105^\circ\text{C}$ . Then, 400 g were placed in a 1 L Erlenmeyer flask and sterilized for 1 h at  $120^\circ\text{C}$ . Each Erlenmeyer flask was inoculated with 20 disks of 5 mm diameter from a 7-day-old actively growing PDA culture of *V. dahliae* V004 and V117 and incubated at  $22\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $216 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fluorescent light, and 12 h period. When *V. dahliae* microsclerotia appeared in the CSW medium, the conidia and mycelia of the inoculum were removed by drying under a constant airflow at  $30^\circ\text{C}$  for 7 d.

Evaluations were performed with cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Coko, Dafisa Spain) and eggplant (*Solanum melongena* var. *esculentum* cv. “Black Beauty”, Agrotterra Spain). Pots of 400 g of capacity (one plant per pot) were used for planting. Sterile peat (1 h at  $120^\circ\text{C}$ , twice consecutively) was used as the substrate and mixed with each inoculum level, then the seedlings were planted. Ten replicate plants per treatment were placed in a completely randomized design. The plants in the growth chamber treatment were adjusted to a photoperiod of 14 h ( $360 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  fluorescent light) and 60-80% HR for 7 weeks, and the plants in the greenhouse were produced and kept under  $26\pm 5^\circ\text{C}$ , 14:10 h photoperiod conditions until the end of the experiment. Once the first symptoms of disease were observed, the plants were monitored weekly using a 0 - 4 scale: 0 =

healthy plant or plant without symptoms, 1 = 1-33% affected plant; 2 = 34-66%; 3 = 67-99%, 4 = dead plant. The percentage of dead plants and symptoms such as marginal leaf spots and irregular growth of twigs were also considered to estimate the disease severity (López-Escudero et al., 2004). The area under the disease progress curve was estimated for each treatment: AUDPC =  $((S_1+S_2)/2)*\Delta T+\dots+(S_{n-1}+S_n)/2)*T$  ( $\Delta T$ = interval in days between observations, S= severity, n = number of observations).

## ***2.6 Effects of the methanol layer of M. brunneum and B. bassiana on the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber***

The evaluation of methanol layer of *M. brunneum* and *B. bassiana* as a fungicidal treatment was conducted. In the methanol layer, the solvent (methanol) was evaporated as above and resuspended in distilled water to the initial volume. The evaluations were performed with cotton plants. V004 microsclerotia were produced in CSW medium and dried as described above. The inocula were mixed with sterilized peat to 7.0%, and 300 g of the mixture were placed in pots of 400 g capacity; the mixture was treated with 10 ml of the methanol fraction (1:30 volume/weight). After 48 h, the cotton plants were transplanted (one plant per pot).

Three controls were established: plants inoculated with *V. dahliae* as above and treated with distilled water, *V. dahliae* plants inoculated as above and treated with the methanol layer obtained from G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium, and uninoculated plants. The greenhouse study was set up as a completely randomized design, with ten replicates. Each experiment was conducted for 7 weeks at 22±2°C. Light and humidity were adjusted to a photoperiod of 14 h (360 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fluorescent light) and 60 - 80% HR. For all experiments, the plants were watered as necessary and fertilized with Hakaphos® Verde (Compo expert, Spain) weekly. Symptoms of the disease were monitored weekly using the previously mentioned 0 - 4 scale to assess the symptoms of *Verticillium* wilt. At the end of the experiment, plant infection was confirmed by isolating the fungus from affected shoots or leaf petioles in affected plants during the experiments. Samples of affected tissue were washed in running tap water, the bark was removed, and the woody tissue surface was disinfected in 0.5% sodium hypochlorite for 1 minute. Wood chips were placed on PDA plates and incubated at 24±1°C in the



dark for 5 d (Martos-Moreno et al 2006). The final disease severity (percentage of affected plants) and the standardized cumulative area under the disease progress curve were determined and analyses of variance were made as above.

### ***2.7 Effects of three applications of the H<sub>2</sub>O-MeOH fraction of M. brunneum on the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber***

The effect of three applications of the H<sub>2</sub>O-MeOH fraction on the progress of Verticillium wilt of cotton was evaluated in growth chamber conditions. Microsclerotia of *V. dahliae* were mixed with sterilized peat at a 7.0% rate, and 300 g of the mixture were placed in pots of 400 g of capacity and treated with the H<sub>2</sub>O-MeOH fraction in a 1:30 ratio (v/w, 10 ml of fraction and 300 g of mixture). The plants were transplanted 48 h after the first application, and the second and third applications were performed at 15 and 30 d after transplanting. The three controls were plants inoculated as above and treated with distilled water or a H<sub>2</sub>O-MeOH fraction from culture medium and uninoculated plants.

Experiments were set up as completely randomized designs. The final disease severity (percentage of affected plants) and the standardized cumulative area under the disease progress curve were determined and analyses of variance were conducted as above.

### ***2.8. Evaluation of the temperature, UV light and pH on fungicide activity of the dialyzed fraction from M. brunneum EAMb 09/01-Su***

To test the effect of incubation temperature, UV light and pH on fungicidal activity, the dialyzed fraction of *M. brunneum* was incubated at 60°C for 2 hours and at 120°C for 20 min and at a light intensity of 920 mW/m<sup>2</sup> for 2, 4 and 6 h in a UV-B Selecta chamber. The effect of pH on the fungicidal activity was also investigated. The pH of the dialyzed fraction was adjusted with 1N NaOH (Fisher Scientific International Company) at 7.5 and 8.5 and incubated at 22±0.5°C for 24 h. The dialyzed fractions were added to the PDA culture at a final concentration of 25.0%. Then, 10 ml of each treatment were dispensed onto 60 mm diameter Petri plates. Petri dishes of 1 mm diameter covered with actively growing *V. dahliae* obtained from PDA culture (7 d colonies) were placed into

the center of the larger Petri plates, and testing for fungicidal activity on mycelial growth was conducted as previously described. Three controls were established; PDA mixed with 25.0% sterile water, PDA mixed with 25.0% dialyzed fraction, and PDA mixed with 25.0% of G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture adjusted to pH 8.5. The plates were incubated at 22±2°C, 216 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fluorescent light and a photoperiod of 12 h. Each treatment had three replicates.

## 2.9. Statistical analysis

Statistic 9 for Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA) was used for statistical analysis. The main treatment and the interactions were calculated by ANOVA after testing for normality and variance homogeneity. Treatment means were compared with control means using the Tukey's HSD test at  $P < 0.05$ , and the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed when the data were not normally distributed.

## 3. Results

### 3.1 Evaluation of crude extracts and their organic fractions against *V. dahliae* and *P. megasperma*.

Crude extracts from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su were highly effective in inhibiting the mycelial growth of *V. dahliae* and *P. megasperma* (Figure 1, 2 and 3). The mycelial growth of both pathogens was totally inhibited (100%) when the crude extract, aqueous chloroform and methanol fractions of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su were applied (Figure 2). However, the chloroform fraction and methanol fraction precipitate of *M. brunneum* EAMb 09/01 inhibited both pathogens by approximately 50% (Figure 2). In contrast, the aqueous chloroform and methanol fractions obtained from *B. bassiana* EABb 09/16-Su had a lower efficiency against the mycelial growth of *P. megasperma*, with 46.7% and 25.2% inhibition, respectively, but inhibited *V. dahliae* V117 by 100% (Figure 3).

### **3.2. Antifungal activity of partial purified fractions from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su**

Fractionation on a chromatographic column yielded an active fraction obtained with H<sub>2</sub>O:MeOH 7:3 (v/v) with inhibition halos of  $15.8 \pm 2.9$  mm, similar to those produced by crude extract ( $20.7 \pm 2.7$  mm) and the dialyzed fraction  $12.5 \pm 0.5$  mm (Table 1). Statistical analysis showed that the H<sub>2</sub>O:MeOH 7:3 v/v 100% fraction was the same as crude extract and the dialyzed fraction and different from the controls (Table 1). Similarly, when the effect of the H<sub>2</sub>O:MeOH fraction of *M. brunneum* was evaluated on the microsclerotia germination of *V. dahliae* in naturally and artificially infested soil, no differences between the treatments and the controls were found. However, a decrease in the germination of microsclerotia in the naturally infested soil and the artificially infested soil treated with the H<sub>2</sub>O:MeOH fraction was observed (Table 2).

### **3.3. Standardization of soil infestation with inoculum of *Verticillium dahliae***

In the two host plants (cotton and eggplant) and the two experimental conditions (growth chamber and greenhouse), treatment with 0.3% of *V. dahliae* (isolates V004 and V117) showed low disease severity (less than 2.0 in the 0-4 scale). On the contrary, treatment 15% of V004 produced the highest disease severity (3.5 in the 0-4 scale). Eggplants were more susceptible to *Verticillium* wilt than cotton, and treatments of 5.0% and 15% V004 caused similar disease severity on eggplants. Disease severity on cotton plants in growth chamber and greenhouse with the 3.0% level of inoculum were statistically similar, but there were significant differences between them with the 0.3% level of inoculum. For both plant species, 5.0% V117 caused less disease than 5.0% V004 (Figure 4). However, analysis of plant tissues showed that both *V. dahliae* isolates had the ability to invade cotton and eggplant tissues. Accordingly, V004 and growth chamber were selected for the evaluation of the organic fractions obtained from the entomopathogenic fungi *M. brunneum* and *B. bassiana* at an intermediate inoculation level, which was estimated to be 7.0% in cotton plants.

### ***3.4 Effect of the H<sub>2</sub>O-MeOH fractions from the entomopathogenic fungi M. brunneum EAMb 09/01 Su and B. bassiana EABb 09/16-Su on the progress of Verticillium wilt of cotton in a growth chamber***

At the end of the experiment, the mean disease severity of Verticillium wilt in plants treated with the methanol fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su was 2.6 (0-4 scale), while the controls (water control and methanol layer medium) had a mean disease severity greater than 3.7 (Fig. 5). In contrast, the mean of severity of Verticillium wilt in plants treated with the methanol fraction of *B. bassiana* EABb 09/16-Su was 3.3, not different from the controls (Fig. 5A). Similarly, the cumulative area under the disease progress curve showed significant differences between treatments. The severity of disease symptoms for the methanol fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su was significantly lower than the controls, while no difference was noted with the methanol fraction from *B. bassiana* EABb 09/16-Su (Fig. 5B).

### ***3.5 Effect of three applications of the H<sub>2</sub>O-MeOH fraction of M. brunneum on the progress of Verticillium wilt of cotton in a growth chamber.***

The effect of three applications of a semi-pure H<sub>2</sub>O:MeOH fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su obtained by column chromatography on the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber conditions showed a statistical difference (Fig. 6). The mean severity of disease in cotton planted in *V. dahliae* (V004) infected soil and treated with a H<sub>2</sub>O control or a H<sub>2</sub>O:MeOH-culture medium control had mean disease severity values of 2.8 and 2.5, respectively, while plants treated with three applications of the H<sub>2</sub>O:MeOH fraction had a mean disease severity value of 1.16 (Fig. 6A). The mean cumulative area under the disease progress curve of Verticillium wilt showed significant differences and the H<sub>2</sub>O:MeOH fraction was different from the H<sub>2</sub>O and the H<sub>2</sub>O:MeOH-culture medium control (Fig. 6B).

### **3.6 Effect of the temperature, UV light and pH on fungicide activity of the dialyzed fraction from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su .**

The evaluation of the abiotic parameters temperature, UV light, and pH showed that the secondary metabolites were resistant to 60°C for 2 h and 120°C for 20 min, as well as 2, 4, and 6 h of exposures to UV light because metabolites exposed to these conditions still inhibited the mycelial growth of *V. dahliae*. However, exposure to pH 7.5 and 8.5 for 24 h diminished the inhibitory effect of the dialyzed fraction against the mycelium of *V. dahliae* (Table 3).

The effect of dialyzed fraction on mycelium formation was observed with a scanning electronic microscope and revealed deteriorated hyphal formation, and a reduction of reproductive structures and conidia production. Microsclerotia germination was also affected; the microsclerotia that germinated on MSPA culture mixed with 25.0% dialyzed fraction formed colonies with mycelial structures free of microsclerotia (Fig. 7).

## **4. Discussion**

*Verticillium dahliae* and *P. megasperma* are the principal root pathogens in orchard olives. Their management is difficult and requires a multidisciplinary approach to find the best strategies for their control. Biological control is an important component of the management of plant health, but it is necessary to gain deeper knowledge to generate more successful strategies. Our research describes an innovative management strategy that meets the modern standards of sustainable agriculture.

The entomopathogenic fungi have been studied and used for insect pest control for many years. However, additional roles in nature have also been discovered, such as endophytic and rhizospheric interactions with plants, antagonism to plant pathogens, induction of systemic resistance, plant growth promotion and the enhancement of nutrient intake and the yield of plants (Quesada-Moraga, et al. 2006, , Kim et al., 2007, Ownley et al., 2008, 2010, Vega et al., 2009, Sasan and Bidochka 2012, 2013), Our results showed that the crude extract, aqueous chloroform and the methanol fractions of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su inhibited the mycelial growth of *V. dahliae* and *P. megasperma* 100%, while the same fractions of *B. bassiana* EABb 09/16-Su inhibited the mycelial growth of *V. dahliae* 100% and the mycelial growth of *P. megasperma* 100%, 46.7% and

25.2%, respectively. These results suggest that *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su strains are not only pathogenic to insects (Lozano-Tovar et al., 2013), but also possess antifungal properties. Similar studies have shown that *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. demonstrate inhibition mechanisms such as antibiosis or competition for space and nutrients and that the entomopathogenic fungi produce fungicidal secondary metabolites (Yong-Xia et al., 2010, Sahab, 2012, Ravindran et al., 2014). These secondary metabolites with fungicidal activity are an attractive alternative for the control of plant pathogens.

An important step towards efficiently evaluating organic fractions obtained from entomopathogenic fungi was the standardization of the soil infestation used to reproduce Verticillium wilt under controlled conditions. Our results showed that the infection was more severe and consistent with a 5.0% and 15.0% inoculum density; more than 80.0% of plants were infected, and the mean progress of disease severity was above 2.5 on a 0-4 scale at 7 weeks. For this reason, a level of 7.0% inoculum (greater than 5.0% but less than 15.0%) was established for the assessment of the organic fractions. Experiments that used plants in growth chamber had the advantage of accurate inoculum control, and their size allowed for the strongest correlation between the data (Martin et al., 1982).

When methanol fractions obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su were evaluated over the progress of Verticillium wilt of cotton in growth chamber conditions, the fraction obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su exhibited clear antagonism against *V. dahliae*, reducing the disease in the infected plants. Both the mean progress of the disease severity (0-4) and the cumulative area under the disease progress curve in the methanol fraction treatment were lower than in the other treatments, reducing the disease severity and the disease progress between 38.9 and 40.8%. Similar results were obtained by Gemma et al. (1984), who found different levels of antagonism when *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *Nomuraea rileyi* were evaluated against *C. ulmi*. Similarly, Wang et al. (2013) found that a crude extract of *Chaetominun aureum* decreased the disease index of rice sheath blight 35.02% in a greenhouse, when were evaluated against *Rhizoctonia solani*.

The partial fractionation of the antifungal activity obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su through chromatography column showed a highly polar active fraction (the semi-pure H<sub>2</sub>O:MeOH fraction). The three applications of the semi-pure H<sub>2</sub>O:MeOH fraction obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su reduced the severity of the disease caused by *V. dahliae* between 54.4 and 58.9%, and produced some healthy plants or plants without symptoms. These results are similar to those obtained by Kang et al. (1996), that confirmed the antifungal activities of *M. anisopliae* against phytopathogens *F. oxysporum*, *B. cinerea* and *A. solani* when culture filtrates of *M. anisopliae* were evaluated. Sasan and Bidochka (2013) demonstrated the antifungal activity of *M. robertsii*, when bean plants colonized by *M. robertsii* were exposed to *F. solani*, showing lower disease indices in comparison with non-colonized plants.

The fungus *V. dahliae* can persist and even increase its inoculum potential in soils and various studies reported a direct correlation between numbers of microsclerotia in the soil and incidence of Verticillium wilt, and also reported that microsclerotia are resistant to desiccation, while conidia and mycelia were sensitive (Erwin and Khan, 1978, López-Escudero and Blanco-Lopez, 2005). It is important to note that the active secondary metabolite affected the mycelial growth of *V. dahliae* and the germination of the microsclerotia of *V. dahliae* not only by reducing the germination but also by deterioration of the hyphal formation, reduction of the reproductive structures and a change in the conformation of the microsclerotia colony, preventing the formation of microsclerotia. This last point is indeed very relevant because the microsclerotia are the most important resistant structures for dissemination of Verticillium wilt in soil (López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

The evaluation of the climatic factors temperature, UV light and pH on the antifungal activity of dialyzed fraction of *M. brunneum* showed that the antifungal activity was stable both at evaluated temperatures (60°C for 2 h and 120°C for 20 min) and to UV light at exposures of 2, 4, 6 h, and its activity was not reduced. However, exposure of the dialyzed fraction to pH 7.5 and 8.5 for 24 h caused negative effects on fungicidal activity assessed by the inhibition of *V. dahliae* mycelial growth. Several studies indicate that pH is an important factor for the antifungal activity of compounds. Prince (1959) found that the antifungal activity of an undecylenic acid was affected

when the pH was 4 to 6. Similarly, Yamada and Azuma (1977), observed that the antifungal activity of allicin was stronger at pH 5.6 than at pH 6.0. Similar results were found by Ogunbanwo et al. (2003), when characterizing the bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *L. brevis* OG1.

We propose that the secondary metabolites with antifungal activity obtained from *M. brunneum* EAMb 09/01-Su represent an alternative for achieving a sustainable control of *V. dahliae* and *P. megasperma* and it could be a response to the lack of control measures against these pathogens in olive orchards. The research on the specific fungicidal compounds produced by *M. brunneum* EAMb 09/01-Su should continue testing these products in field conditions.



## 5. References

- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J. Antibiot.* 58, 1-26.
- Boss, D., Maurhofer, M., Schaläpfer, E., Defago, G. 2007. Elsinochrome A production by the bindweed biocontrol fungus *Stagonospora convolvuli* LA 39 does not pose a risk to the environment or the consumer of treated crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 194-205.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazzaa, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosioa, M., Puglia, A. 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 99,187-198
- Dutta, B.K. 1980. Studies on wilt disease caused by *Verticillium albo-atrum* R & B in relation to some systemic fungicides. *J. Indian Bot. Sci.* 59, 81-89.
- Erwin, D.C., Tsai, S.D., Khan, R. A. 1978. Reduced number of microsclerotia formed by *Verticillium dahliae* in cotton tissue exposed to systemic Benzimidazole fungicides and desiccation. *Phytopathology.* 68, 1488-1494.
- Faris, M. A., Sabo, F.E. 1981. Effect of *Phytophthora megasperma* on yield and survival of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 61, 955-960.
- Fradin, E., Thomma, B. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7, 71-86.
- Garrido-Jurado, I., Ruano, F., Campos, M., Quesada-Moraga, E. 2011. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biol. Control* 59, 239-244
- Gemma, J., Hartmann, G., Wasti, S. 1984. Inhibitory interactions between *Ceratocystis ulmi* and several species of entomopathogenic fungi. *Mycologia* 76, 256-260.
- Gohel, V., Singh. A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatpar, H. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. 2006. *African Journal of Biotechnology* 5, 54-72. **Afr. J. Biotechnol.**
- Hu, G., Leger, R. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6383-6387.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, I.M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C. 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant Dis.* 96, 304-329.
- Kabaluk, J., Ericsson, J. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agron. J.* 99, 1377-1381.
- Kang, C.S., Goo, B.Y., Gyu, L.D., Heon, K.Y. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alteraria solani*. *Korean J. Mycol.* 24, 49-55.
- Kim, J., Goettel, M., Gillespie, D. 2007. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biol. Control* 40, 327-332.
- Knight, V., Snaglier, J.J., Ditullio, D. Braccili, S., Bonner, P., Waters, J., Hughes, D., Zhang, L. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 62, 446-458.
- Konstantopoulou, M., Milonas, P., Mazomenos, B. 2006. Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 1657-1664.
- Kouyeas, H., Chitzanidis, A. 1968. Notes on Greek species of *Phytophthora*. *Ann. Instit. Phytopathol. Benaki* 8, 175-192.
- Leger, S., Wang, R., Fang, W. 2011. New perspective on insect pathogens. *Fungal Biol. Rev.* 25, 84-88.
- López- Escudero, F., Nuñez-Santos, D., Blanco-López, M. 2003. Aislamiento de *Verticillium dahliae* de suelo y caracterización morfológica de sus microesclerocios. *Bol. Sanid. Veg* 29, 613-62
- López-Escudero, F. J., Blanco-lópez, M. A. 2005. Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 113, 365-375.

- López-Escudero, F., del Rio, C., Caballero, J., Blanco-López, M. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. Eur. J. Plant Pathol. 110, 79-85
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J. 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. Plant Soil 344,1-50.
- López-Escudero, F., Mwanza, C., Blanco-López, M. 2007. Reduction of *Verticillium dahliae* microsclerotia viability by dried plant residues. Crop Prot. 26, 127-133.
- Lozano-Tovar, M.D., Ortiz- Urquiza A. Garrido-Jurado, I., Trapero-Casas A., Quesada-Moraga, E. 2013 Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. Biol. Control 67, 409-420.
- Martos-Moreno, C., López-Escudero, F. J., and Blanco-López, M. A. 2006. Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. HortScience 41, 1313-1316
- Martin, M.J., Riedel, R.M., Rowe, R.C. 1982. *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans*: Interactions in the early dying complex of potato in Ohio. Phytopathology 72, 640-644.
- Molnár, I., Gibson, D., Krasnoff, S. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Nat. Prod. Rep. 27, 1241-1275.
- Morales-Lizcano, N., Dobinson, K. 2013. *Verticillium dahliae* hydrophobins: a multifunctional family. 11<sup>th</sup> International Verticillium Symposium Germany.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I., Onilyde. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. Biotechnol. 2, 219-227.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Borrego, A., Quesada-Moraga, E. 2010. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota:Hypocreales). Pest. Manag. Sci. 66, 725-735.
- Ownley, B. Griffin, M., Klingeman, M., Gwinn, W. Moulton, K., Pereira, R. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology 98, 267-270.
- Ownley, B., Gwinn, K., Vega, F. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. Biocontrol 55, 113-128.
- Parine, N.R., Pathan, A.K. Sarayu, B., Nishanth V.S., Bobbarala, 2010. Antibacterial efficacy of secondary metabolites from entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Indian. J. Chem. Anal. Sci. 1, 94-96.
- Pegg, G.F., Brady, B.L. 2002. Verticillium wilts. CAB International, Wallingford, London, UK.
- Prince, H. 1959. Effect of pH on the antifungal activity of undecylenic acid and its calcium salt. J. Bacteriol. 78, 788-791.
- Quesada-Moraga, E., Landa, B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R., Santiago-Álvarez. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia 161, 323-329.
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., Sivaramakrishnan, S. 2014. Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against plant phytopathogenic fungi. In: Kharwar *et al.* (Eds.), Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Springer India, pp. 251-255.
- Sahab, A. 2012. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. J. Appl. Sci. Res. 8, 1441-1444.
- Sánchez-Hernández, E., Muñoz-García, M., Brasier, C.M., Trapero-Casas, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. Plant Dis. 85, 411- 416.
- Sánchez-Hernández, E., Ruiz-Davila, A., Pérez de Algaba, A., Blanco-López, M., Trapero-Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. Eur. J. Plant Pathol. 104, 347-357.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. Am. J. Bot. 99: 101-107.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. phaseoli. Can. J. Plant Pathol. 35, 288-293.

- Shubakov, A., Kucheryavykh, S. 2004. Chitinolytic activity of filamentous fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40, 445-447.
- Teviotdale, B.E. 1994. Diseases of olive. In: Olive production manual. Ferguson, L. Sibbett, G.S., Martin, G.C. (eds). Publication 3353, University of California.
- Trapero, A., Jiménez, R. 1985. Etiología, importancia y distribución de la seca del garbanzo en el Valle del Guadalquivir. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica, Madrid, pp. 53-54.
- Vega, F. Goettel, M. Blackwell, M. Chandler, D. Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2, 149-159.
- Vey, A., Hoagland, R. Butt, T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (eds), *Fungal as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI, Wallingford, pp. 311-346.
- Wang, C., Leger, R.J. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell* 6, 808-816.
- Wang, Y., Liu, S. Mao, X., Zhang, Z., Jiang, H., Chai, R., Qiu, H., Wang, X., Li, B., Sun, G. 2013. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1480-1490.
- Xiong, D., Wang, Y., Xiao, J., Tian, C. 2013. Transcriptome analysis of microsclerotia development in smoke tree vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. 11<sup>th</sup> International Verticillium Symposium, Germany.
- Yamada Y., Azuma, K. 1977. Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. 11, 743-749.
- Yong-Xia, Q., Fang-Xin, C., Zeng-Zhi, L. 2010. Inhibitory mechanisms of *Metarhizium anisopliae* against the pathogens of Fusarium wilt of cotton. *J. Cotton Sci.* 22, 591-596.

**Table 1.** Fungicide test of the fractions obtained of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su through dialysis and column chromatographic (mean  $\pm$  SE).

Crude extract and crude extract and its organic fractions	Halo formation <sup>a</sup>	Halo size (mm diam.) <sup>b</sup>
Crude extract	+	20.77 $\pm$ 2.75 a
Dialyzed fraction	+	12.48 $\pm$ 0.49 b
EtOAc:2-propanol 1:9 v/v 100% fraction	-	0.0
H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3 v/v 100% fraction	+	15.84 $\pm$ 2.93 ab
H <sub>2</sub> O-control	-	0.0
G <sub>40</sub> P <sub>20</sub> - H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3 v/v control	-	0.0

<sup>a</sup>+ Positive halo formation. – Negative halo formation.

<sup>b</sup>Petri plates were spread with 200  $\mu$ l conidial suspension of 10<sup>6</sup> conidial/ml from *V. dahliae*, then with perforating punches, these were drilled in the center of plate and then 50  $\mu$ l on each filtered fractions were applied at the site of the perforation. Means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected HSD Tukey test at  $P = 0.05$

**Table 2.** Evaluation of the semi-pure H<sub>2</sub>O:MeOH (7:3 v/v) fraction of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su against *Verticillium dahliae* microsclerotia germination in naturally and artificially infested soils (microsclerotia /g of soil  $\pm$  SE)

Treatment	Artificially infested soil <sup>a</sup>	Naturally infested soil <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O-control	5.66 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 1.42 ab	81.2 $\pm$ 5.3 a
H <sub>2</sub> O:MeOH-culture medium control	15.91 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 5.31 a	56.7 $\pm$ 3.8 ab
Dialyzed fraction	2.42 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 1.99 ab	41.2 $\pm$ 10.6 b
H <sub>2</sub> O:MeOH fraction	2.37 x 10 <sup>3</sup> $\pm$ 1.24 b	48.9 $\pm$ 6.1 b

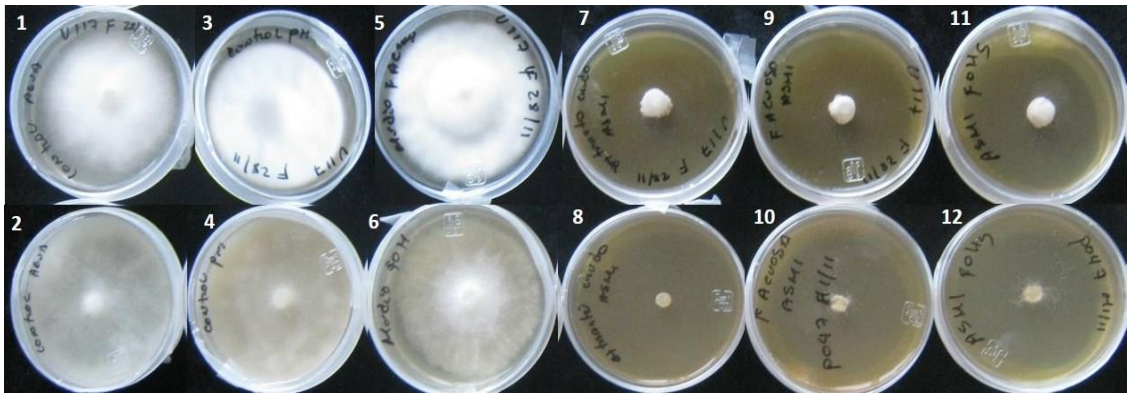
<sup>a</sup> Germinated microsclerotia/g of artificially infested peat moss.

<sup>b</sup> Germinated microsclerotia /g of naturally infested soil. Means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected HSD Tukey test at  $P = 0.05$

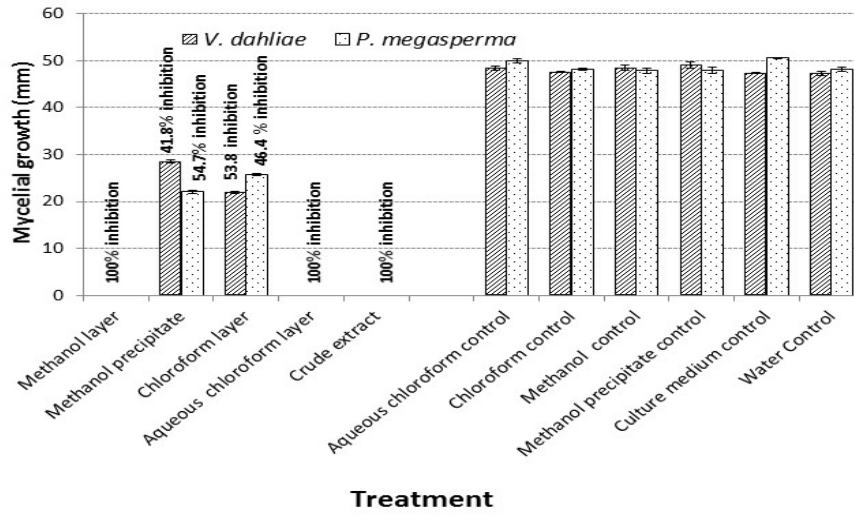
**Table 3.** Effect of the temperature, UV light exposure, and pH on fungicidal activity of the dialyzed fraction from *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su (mean  $\pm$  SE)<sup>a</sup>

Temperature, UV light and pH	Mycelial growth of <i>Verticillium dahliae</i> (mm)
<b>Temperature</b>	
Dialyzed at 60°C for 2 hours	7.2 $\pm$ 0.2 c
Dialyzed at 120°C for 20 min	6.6 $\pm$ 0.9 c
<b>UV light</b>	
Dialyzed at 2 h UV light	3.2 $\pm$ 1.7 c
Dialyzed at 4 h UV light	3.0 $\pm$ 1.7 c
Dialyzed at 6 h UV light	3.5 $\pm$ 1.9 c
<b>pH</b>	
Dialyzed at 7.5 pH	23.1 $\pm$ 1.0 b
Dialyzed at 8.5 pH	28.1 $\pm$ 1.6 ab
<b>Controls</b>	
Dialyzed control (positive)	3.8 $\pm$ 2.0 c
PDA culture medium	32.5 $\pm$ 0.3 a
PDA + Dialyzed G <sub>40</sub> P <sub>20</sub> culture medium	32.0 $\pm$ 0.6 a

<sup>a</sup>The dialyzed fraction of *M. brunneum* EAMb 09/01-Su was incubated at 60°C for 2 hours or at 120°C for 20 min and exposed to UV light for 2, 4 and 6 h in the UV Selecta chamber of 920 mWm<sup>-2</sup>. The pH of the dialyzed fraction was adjusted with 1N NaOH to 7.5 and 8.5 and then incubated at 22  $\pm$  0.5°C for 24 h. The treatments were mixed with PDA culture to a final concentration of 25%. The initial pH of the dialyzed fraction was 3.78  $\pm$  0.67. Means with a common letter are not significantly different according to Fisher's protected HSD Tukey test at  $P = 0.05$ .

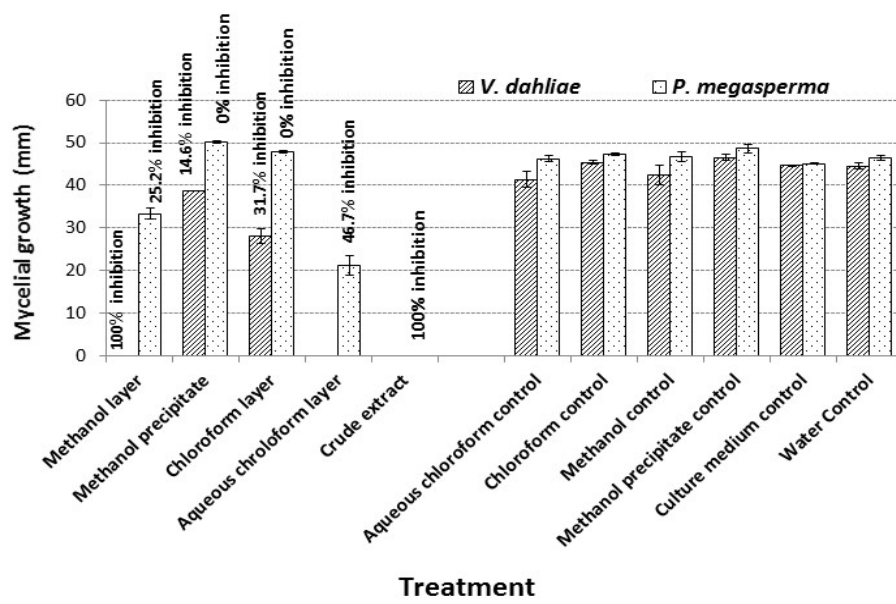


**Figure 1.** Effect of the aqueous chloroform and methanol fractions of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su against the mycelial growth of *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma*. Control PDA *V. dahliae* (1). Control PDA *P. megasperma* (2). Control pH *V. dahliae* (3). Control pH *P. megasperma* (4). Aqueous chloroform fraction culture control *V. dahliae* (5). Methanol fraction culture control *P. megasperma* (6). Crude extract against *V. dahliae* (7). Crude extract against *P. megasperma* (8). Aqueous chloroform fraction against *V. dahliae* (9). Aqueous chloroform fraction against *P. megasperma* (10). Methanol fractions against *V. dahliae* (11). Methanol fractions against *P. megasperma* (12).

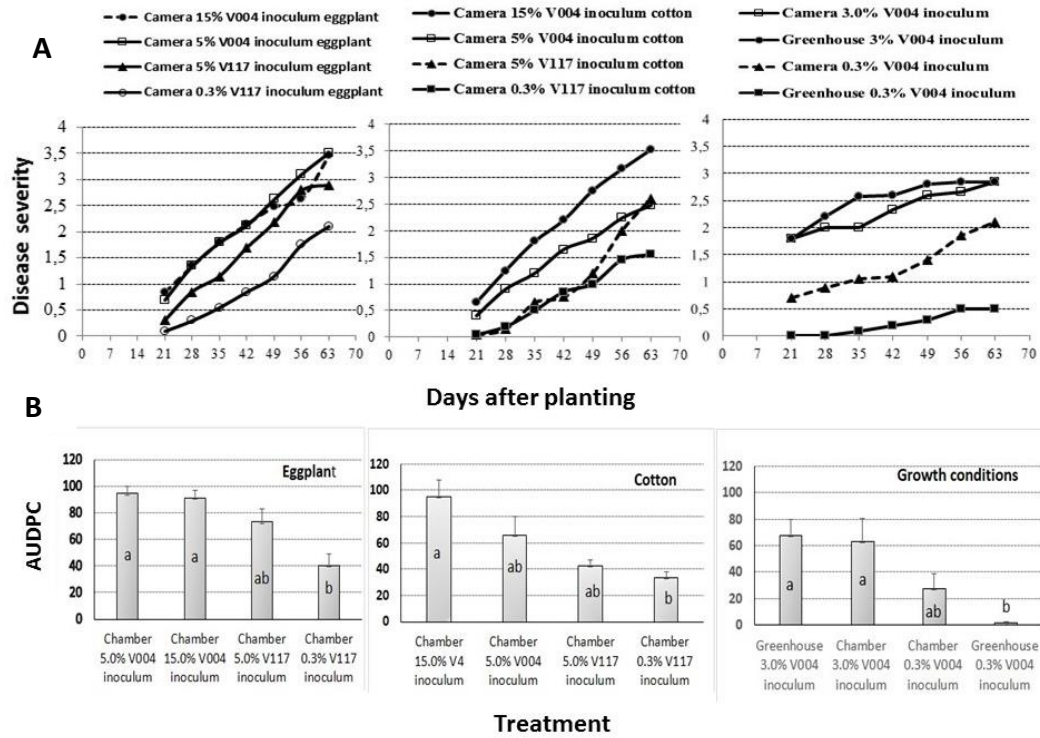


**Figure 2.** Evaluation of the crude extract obtained of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su and its organic fractions against the mycelial growth of *P. megasperma* and *V. dahliae*. The controls were water and the fractions obtained by splitting the G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium.

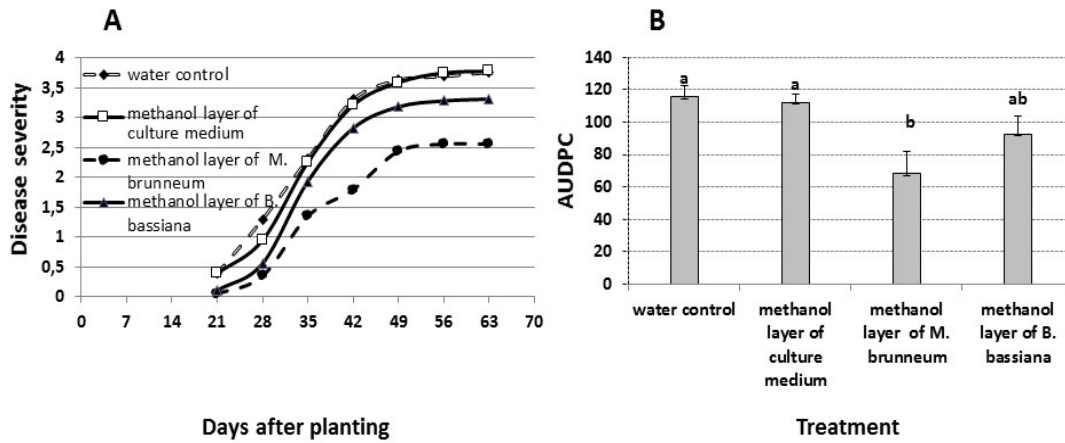




**Figure 3.** Evaluation of the crude extract obtained from *Beauveria bassiana* EABb 09/16-Su and its organic fractions against the mycelial growth of *Phytophthora megasperma* and *Verticillium dahliae*. The controls were water and the fractions obtained by splitting the G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> culture medium.



**Figure 4.** Disease severity in eggplant (*Solanum melongena* var. *esculentum* cv. “Black Beauty”) and cotton (*Gossypium hirsutum* cv. “Coko”) inoculated with different levels of inoculum of isolates V004 and V117 of *Verticillium dahliae* and two growth conditions (growth chamber and greenhouse). **A**, The severity of plant symptoms was assessed weekly for 7 weeks by using a 0-4 rating scale (0= healthy plant or plant without symptoms, 1= affected plant in 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= dead plant). **B**, The cumulative area under the disease progress curve (AUDPC). Treatments with a common letter are not significantly different according to the Kruskal-Wallis test at  $P = 0.05$ .



**Figure 5.** Effect of the methanol fraction obtained from entomopathogenic fungi *M. brunneum* EAMb 09/01-Su and *B. bassiana* EABb 09/16-Su on the severity of *Verticillium* wilt of cotton in a growth chamber. **A**, Time progress of disease severity on cotton seedlings planted in a peat moss soil artificially infested with *V. dahliae* V004 isolate. **B**, Mean values of the area under the disease progress curve (AUDPC). Disease severity was assessed using a 0-4 rating scale (0= healthy plant or plant without symptoms, 1= affected plant in 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= dead plant). Water and the methanol fraction medium were used as controls. Treatments with a common letter are not significantly different according to the Kruskal-Wallis test at  $P = 0.05$

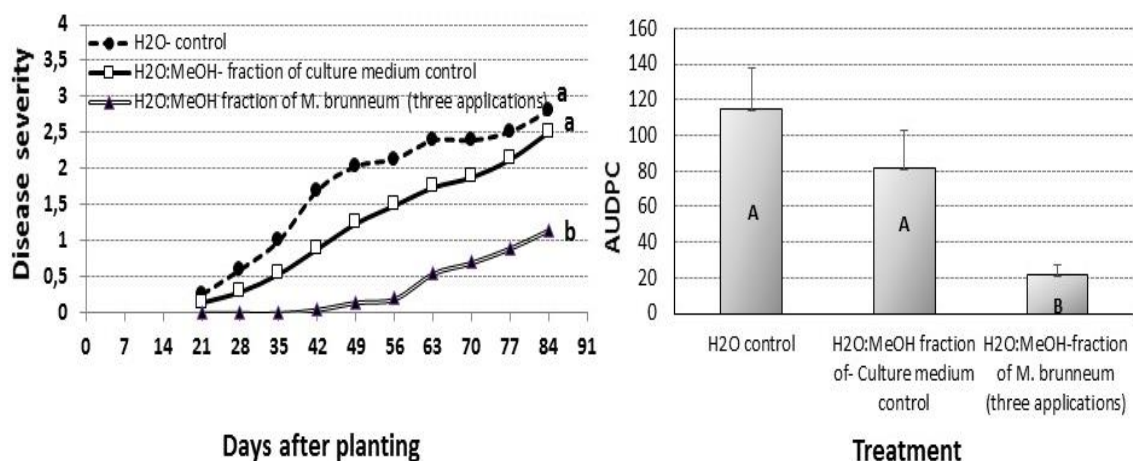
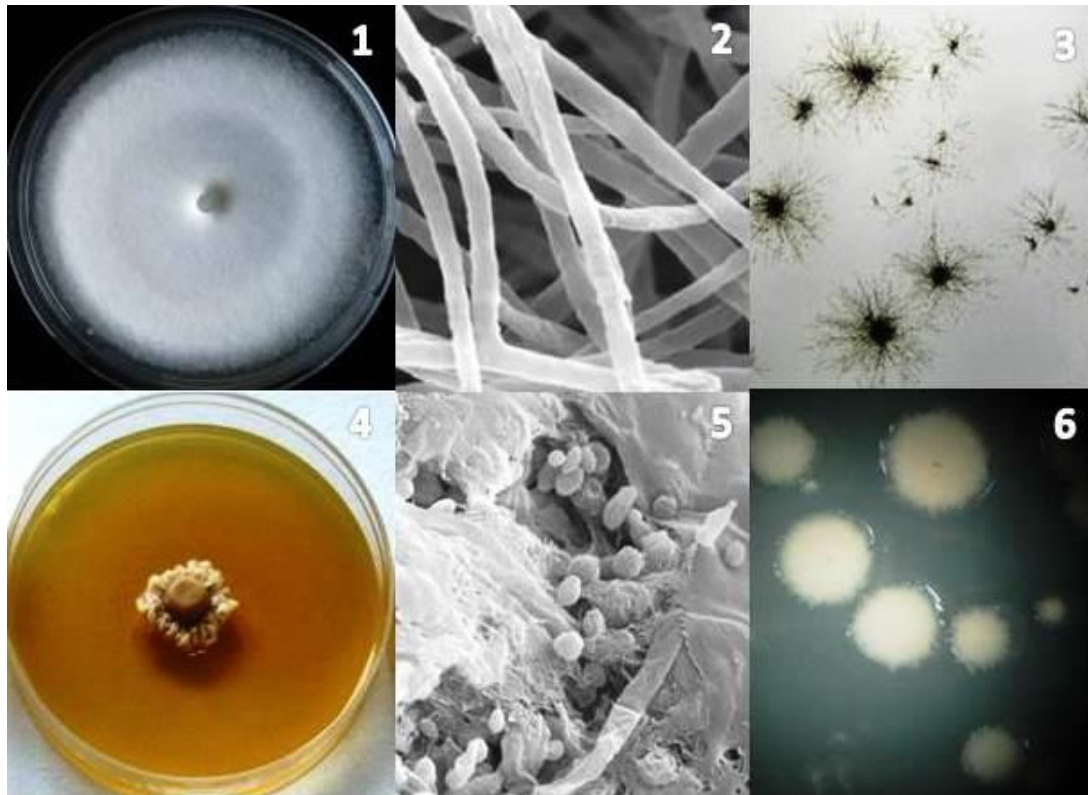


Figure 6. Effect of the H<sub>2</sub>O-MeOH (7:3 v/v) fraction obtained from the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01-Su on the severity of Verticillium wilt of cotton in a growth chamber. A, Time progress of disease severity on cotton seedlings planted in a peat moss soil artificially infested with *V. dahliae* V004 isolate. B, Mean values of the area under the disease progress curve (AUDPC). Disease severity was assessed using a 0-4 rating scale (0= healthy plant or plant without symptoms, 1= affected plant in 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= dead plant). Water and the H<sub>2</sub>O-MeOH medium were used as controls. Treatments with a common letter are not significantly different according to the Kruskal-Wallis test  $P = 0.05$



**Figure 7.** Effect of the dialyzed fraction of *Metarhizium brunneum* EAMb 09/01 Su on hyphal growth and microsclerotial colonies of *V. dahliae*. 1) Normal growth of mycelium of *V. dahliae* on PDA culture. 2) Normal hyphae of *V. dahliae* on PDA culture. 3) Normal microsclerotia colonies germinated on MSPA culture. 4) Anomalous mycelial growth of *V. dahliae* on PDA culture mixed with 25% of the dialyzed fraction. 5) Anomalous hyphae of *V. dahliae* growth on PDA mixed with 25% of the dialyzed fraction. 6) Anomalous microsclerotia germination on MSPA culture mixed with 25% of the dialyzed fraction (colonies are free of microsclerotia).



## IV. DISCUSIÓN GENERAL



## 1. Discusión

Uno de los grandes retos de la agricultura actual es producir mayor cantidad de alimentos bajo los principios de la agricultura sostenible para una población humana en crecimiento. La presión social para reducir el uso de plaguicidas en las prácticas agrícolas ha logrado que se estimule la búsqueda de nuevas estrategias de control con un enfoque integral en el cual los métodos biológicos son una parte importante. Este enfoque hacia un sistema integrado de prácticas de producción de plantas y animales no solo busca satisfacer las necesidades de alimentos y fibras necesarios para la población humana, sino que también busca mejorar la calidad del medio ambiente y el uso eficiente de los recursos naturales, así como la calidad de vida de los agricultores y la sociedad en su conjunto.

El cultivo del olivo es de gran importancia en España y su cosecha se ve mermada en cantidad y calidad por insectos y enfermedades, cuyo control, cuando es posible, aún se sostiene principalmente en la aplicación de insecticidas y fungicidas químicos de síntesis. La mosca del olivo *Bactrocera oleae* y los patógenos *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora inundata* son algunos de los principales factores bióticos limitantes de la producción del cultivo del olivo.

La presente investigación multidisciplinaria fue abordada para explorar la posibilidad del control dual de insectos y patógenos de suelo mediante hongos entomopatógenos. Durante décadas los hongos entomopatógenos han sido vistos y utilizados como una estrategia de regulación de insectos plagas, sin embargo recientemente se ha descubierto que varios



entomopatógenos (Ascomycota: Hypocreales), exhiben además otros modos econutricionales, es decir que no solamente pueden actuar contra insectos, sino que también pueden afectar a hongos fitopatógenos, además de mejorar la productividad y sanidad de las plantas actuando como promotores de crecimiento vegetal (Kabaluk y Ericsson, 2007, Shahid et al., 2012, Sasan y Bidochka 2012; 2013)

Los resultados de esta investigación demostraron que los aislados de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. procedentes de hojas y suelo del olivo evaluados sobre los estados preimaginales (larvas de tercer instar y puparios) de *C. capitata* presentaron capacidad patogénica diferencial, con rangos de mortalidad entre 5% y 45%. Varias investigaciones han demostrado que los estados preimaginales de los tefrítidos, en particular los puparios son menos susceptibles a los hongos

entomopatógenos (Kaaya y Munyinyi, 1995, Ekesi et al., 2002; 2007). Esto es debido a las características de la cutícula de los estados larvales de tercer instar y los puparios que le confieren una barrera a la penetración de los hongos entomopatógenos. Además, de acuerdo con Vanninen et al. (1999), los estados de los insectos que viven en el suelo desarrollan un alto nivel de resistencia a la infección por microorganismos debido a la selección natural, ya que en el hábitat del suelo han coevolucionado con un gran número de éstos. Cossentine et al. (2010), por ejemplo lograron una elevada micosis sobre larvas de *Rhagoletis* y baja sobre pupas, sin embargo los rangos estuvieron entre 23 y 35%.

Un aspecto interesante de nuestro trabajo fue el análisis de la supervivencia de los puparios de *C. capitata* tratados con hongos entomopatógenos, ya que el rango de supervivencia entre aislados fue

de 2.5% - 50%, mientras que en el tratamiento control la supervivencia fue del 76.6%, lo cual indica un efecto de los hongos sobre la reducción de la población del insecto. También fue de interés la micosis que se observó en los adultos que lograron emerger de los puparios tratados y que murieron 3 días después de la emergencia; es decir, que los tratamientos con hongos entomopatógenos no solo afectaron el estado diana (larvas de tercer instar y puparios), sino que además afectaron a los adultos que lograron emerger, esto presupone la reducción de la siguiente generación, además de la transmisión horizontal de la micosis que se da entre los adultos como lo demostraron los trabajos de Quesada-Moraga et al (2006; 2008). Todo lo anteriormente expuesto es un factor importante que contribuye a reducir sustancialmente las poblaciones del insecto en una estrategia de manejo integrado.

Igualmente con este trabajo se ha determinado que los hongos entomopatógenos estudiados tienen efectos fungicidas. Los aislados EABb 09/16-Su y EABb 09/07-Fil de *B. bassiana*, EABb 09/23-Su de *B. pseudobassiana* y EABv 09/01-Su de *B. varroae* inhibieron el crecimiento micelial de *P. megasperma* y *P. inundata* entre un 43.7% y un 61.3%, respectivamente, y entre un 51.7% y 56.7% el de *V. dahliae*. Además de esto, otro aspecto observado fue el crecimiento y esporulación de los hongos *M. brunneum* y *B. bassiana* sobre los fitopatógenos, mostrando un comportamiento de micoparasitismo similar a las especies de *Trichoderma*.

Respecto a la supresión de enfermedades con hongos entomopatógenos, trabajos realizados con *Beauveria* spp y *Lecanicillium* spp. (Ascomycota: Hypocreales), muestran interacciones que afectan a diversos

hongos fitopatógenos (Ownley et al., 2004, Vega et al., 2008; 2009) y ambos han sido citados como efectivos supresores de enfermedades en plantas, cuyo modo de acción estaría relacionada con antibiosis, competencia por espacio y nutrientes y los efectos relacionados con la colonización endofítica (Goettel et al., 2008, Ownley et al., 2010, Kim et al., 2010).

En nuestra investigación se pudo constatar que uno de los mecanismos de acción contra los fitopatógenos del olivo estuvo relacionado con la antibiosis, ya que los aislados de *V. dahliae* y *Phytophthora* spp. presentaron halos de inhibición y reducción del crecimiento micelial en los tratamientos con cultivos duales, extractos crudos, fracciones dializadas, adializadas y orgánicas obtenidas de los hongos entomopatógenos. Cuando los aislados de *V. dahliae* (V004 y V117)

y *Phytophthora* spp (PO20, PO47) fueron expuestos a los extractos de *B. bassiana* (EABb 09/16-Su), *M. brunneum* (EAMa 01/58-Su) a una concentración de 100 µg de proteína/ml, la susceptibilidad de cada patógeno a los extractos fue diferente registrándose valores de inhibición del crecimiento micelial entre 83.2 y 100%. Igualmente las fracciones dializadas de ambos entomopatógenos lograron inhibir el crecimiento micelial entre un 97.5 y 100%, mientras que la fracción adializada obtuvo promedios de inhibición entre un 32.1 y 65.5. Esos resultados indican que la mayor actividad fungicida estuvo relacionada con moléculas menores a 3500 Da y que algunas de éstas moléculas pueden quedar retenidas en la fracción adializada, o por el contrario que la actividad fungicida de estas cepas está representada por más de un tipo de compuesto, lo cual es importante dilucidar en futuras investigaciones.

Además, se observaron efectos negativos sobre la germinación y formación de colonias de los propágulos de los microorganismos patógenos, los extractos de *B. bassiana* y *M. brunneum* tuvieron la capacidad de inhibir la germinación de todos los propágulos entre 54.3 y 100%. Tanto *Metarhizium* spp. como *Beauveria* spp. producen un amplio número de metabolitos bioactivos, los cuales han sido citados como limitantes del crecimiento *in vitro* de patógenos de plantas (Ownley et al., 2010, Oller-López et al. 2005). Respecto al género *Metarhizium* las citas sobre actividad fungicida son relativamente escasas, sobresaliendo el trabajo de Kang et al (1996), en el cual se demuestra la actividad antifúngica de *M. anisopliae* contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*; así como el trabajo de Sasan y Bidochka (2013), en el cual también se evaluó la actividad antifúngica de

*Metarhizium robertsii* contra *Fusarium solani*.

Cuando se evaluaron los extractos crudos de hongos entomopatógenos obtenidos de aislados de *M. brunneum*, *M. guizhouense* y *B. bassiana* frente a adultos de *C. capitata* se presentaron diferencias de mortalidad entre los aislados. El extracto del aislado EAMb 09/01-Su fue el más activo, causando el 100% de mortalidad, seguido del aislado EAMr 09/01-Su, el cual causó el 86.8% de mortalidad en los adultos tratados.

El fraccionamiento orgánico por HPLC del extracto obtenido del aislado EAMb 09/01-Su de *M. brunneum* permitió detectar 13 compuestos relacionados en su mayoría con destruxinas. El análisis LC-MS determinó que las masas moleculares de estos compuestos se encontraban entre 453 y 611 [M + H]<sup>+</sup>. La evaluación de la actividad insecticida de los 13 compuestos

(denominados en este estudio como sub-fracciones) arrojó dos compuestos con alta actividad. Las sub-fracciones F5B y F6 registraron mortalidades sobre *C. capitata* de 70 y 100% a las 48 h después del tratamiento. De acuerdo con el análisis de masas, estos compuestos están relacionados con las destruxinas A<sub>2</sub> y A, resultados que fueron confirmados con ultra-cromatografía de alta presión UHPLC. Por lo tanto, se puede afirmar que los adultos de *C. capitata* son susceptibles a las destruxinas A y A<sub>2</sub>. Estos resultados son consistentes con los resultados de otras investigaciones sobre las propiedades insecticidas de las destruxinas. La destruxina A ha sido referenciada con actividad insecticida sobre *Spodoptera litura*, con mortalidad del 65% a las 96 h después de tratadas con una concentración de 300 ppm (Hu et al., 2007). La inyección de destruxina A en adultos de *Drosophila*

*melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) dio como resultado una CL<sub>50</sub> (concentración letal media) de 0.11 mM (Ruiz-Sánchez and O'Donnell 2012). También ha sido referenciada como supresora de la respuesta inmune de los insectos a la invasión por hongos entomopatógenos (Pal et al. 2007). Estudios con larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y *Phaedon cochleariae* (Coleoptera: crisomelidae), han mostrado alta susceptibilidad de estos dos insectos a la destruxina A, con CL<sub>50</sub> de 30 y 17 ppm, respectivamente (Amiri et al. 1999). Las destruxinas A y A<sub>2</sub>, también han mostrado ser tóxicas contra *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) (James et al. 1993).

En este estudio también se ha profundizado en la actividad biológica de la sub-fracción F6 contra los adultos de *C. capitata*. Los resultados mostraron que la mortalidad de los insectos estuvo

relacionada con la dosis. La  $CL_{50}$  fue de 104.92 ppm, y la  $TL_{50}$  fue 4.16 h a una concentración de 400 ppm de destruxina A contenida en la sub-fracción F6. De gran importancia fueron los resultados observados con los tiempos de exposición de los adultos a la alimentación tratada con la sub-fracción F6. A la concentración de 400 ppm de destruxina A, la mortalidad de los adultos expuestos durante una hora a la dieta tratada fue del 70% a las 18 h del tratamiento, con un TMS (tiempo medio de supervivencia) de 12.6 h. Ahora bien, cuando los adultos fueron alimentados durante 12 h la mortalidad subió al 90% a las 18 h después del tratamiento y la TMS se redujo a 3.6 h, con efecto de mortalidad aguda de 83.3% (a las 0 h después del tratamiento). Estos resultados son altamente relevantes ya que uno de los mayores obstáculos que limita la comercialización de los bioplaguicidas es su baja velocidad

de acción (Khan et al. 2012). El extracto crudo de nuestro aislado de *M. brunneum*, así como sus sub-fracciones F5B y F6, mostraron alta eficiencia en el control de adultos *C. capitata* en tiempos relativamente muy cortos con efectos de mortalidad aguda y crónica.

Igualmente la actividad fungicida del extracto y las fracciones orgánicas obtenidas del aislado EAMb09/01-Su fueron evaluados sobre *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora inundata* *in vitro* e *in vivo*. El extracto crudo, la fracción acuosa clorofórmica y la fracción metanólica de *M. brunneum* EAMb09/01-Su inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* y *P. megasperma* en un 100%. Asimismo, cuando la fracción metanólica obtenida de *M. brunneum* EAMb09/01-Su fue evaluada sobre el progreso de la Verticilosis en plantas de algodón, mostró un efecto significativo contra

*V. dahliae*, reduciendo los síntomas de la enfermedad en las plantas infectadas. Tanto el promedio de los síntomas de la verticilosis como el área bajo la curva de progreso de la enfermedad fue más baja cuando se aplicó la fracción metanólica de *M. brunneum* reduciendo la severidad entre un 38.9 y 40.8%. Resultados similares fueron obtenidos por Gemma et al. (1984), quienes encontraron diferentes niveles de antagonismo contra *Ceratocystis ulmi*, cuando evaluaron aislados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. En el mismo sentido Wang et al. (2013), encontraron reducción del tizón de la vaina del arroz (35.02%), cuando evaluaron cultivos de *Chaetominun aureum* libres de células contra *Rhizoctonia solani*.

El fraccionamiento parcial a través de cromatografía de columna de la fracción dializada de *M. brunneum* EAMb09/01-Su

mostró una fracción (H<sub>2</sub>O:MeOH 7:3 v/v), con propiedades antifúngicas y características altamente polares. La evaluación de tres aplicaciones de esta fracción semipura H<sub>2</sub>O:MeOH (7:3 v/v), obtenida de *M. brunneum* EAMb09/01-Su sobre el desarrollo de la Verticilosis en algodón mostró una disminución de la severidad de la enfermedad entre 54.4 y 58.9%, logrando algunas plantas sanas (sin síntomas). Investigaciones de Kang et al (1996) han confirmado las actividades antifúngicas de filtrados de *M. anisopliae* contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Botrytris cinerea* y *Alternaria solani*. Sasan y Bidochka (2013) demostraron también actividad fungicida de *Metarhizium robertsii*, cuando plantas de frijol fueron colonizadas por *M. robertsii* y expuestas luego a *Fusarium solani*. Las plantas colonizadas por *M. robertsii*

crecieron mejor y los niveles de enfermedad fueron menores comparados con las plantas no colonizadas por *M. robertsii*.

Otro aspecto importante a resaltar es que los metabolitos obtenidos de *M. brunneum* no solamente deterioraron la formación de hifas sino que afectaron a los microesclerocios de *V. dahliae*, reduciendo su germinación e impidiendo la formación de nuevas colonias de microesclerocios, en aquellos que lograron germinar. Este punto es importante ya que los microesclerocios son las estructuras de resistencia y diseminación de *V. dahliae* en el suelo (López-Escudero, Mercado-Blanco, 2011).

La tolerancia a factores ambientales como la temperatura y la luz ultravioleta es un factor importante para el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos y un parámetro de selección de candidatos para la producción de un bioproducto.

Tanto la actividad insecticida como la fungicida fue estable cuando los metabolitos fueron sometidos a temperaturas de 60°C por 2 h y 120°C por 20 minutos, la actividad insecticida se mantuvo por encima del 90% y la fungicida por encima del 77%.

En este estudio también se logró evaluar el efecto del pH sobre actividad fungicida. Los resultados indicaron que estos metabolitos disminuyen su capacidad fungicida en pH básico, con una reducción del 60%, cuando se evaluó la fracción dializada tratada a pH 8.5. Igualmente, cuando se evaluó la fracción dializada sobre la germinación de microesclerocios presentes en un suelo naturalmente infestado con pH básico, la reducción de la germinación de los microesclerocios solo fue del 13.7% mientras que en el suelo artificialmente infestado con pH ácido, la reducción de la germinación de los microesclerocios



fue del 58.1%, lo cual indica que los metabolitos fungicidas son susceptibles a cambios de pH, factor que se debe tener en cuenta en una posible formulación de un producto. Varios estudios indican que el pH es un factor importante sobre la actividad antifúngica de varios compuestos. Prince (1959), encontró que la actividad fúngica del ácido undecilénico fue afectada cuando el pH fue ajustado a un valor de 4 a 6. De la misma manera, Yamada y Azuma (1977) observaron que la actividad antifúngica de la Alicina fue fuertemente afectada cuando pasó de un pH de 5.6 a 6. Resultados similares fueron encontrados por Ogunbanwo et al. (2003), cuando caracterizaron a una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* F1 y una de *Lactobacillus brevis* OG1. La Mayor actividad del extracto obtenido de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 se obtuvo a pH 4.2 y se redujo sustancialmente a partir de pH 6

(Todorov y Dicks, 2005, Zapata et al. 2009).

## 2. Referencias bibliográficas

- Amiri-Besheli B, Ibrahim L, Butt T, 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pest. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 487-498.
- Cossentine, J., Thistlewood, H., Goettel, M., Jaronski, S. 2010. Susceptibility of preimaginal western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Clavicipitaceae (Hypocreales). *Invertebrate Pathology* 104: 105-109.
- Gemma, J., Hartmann, G., Wasti, S. 1984. Inhibitory interactions between *Ceratocystis ulmi* and several species of entomopathogenic fungi. *Mycologia* 76: 256-260.
- Goettel, M.S., Inglis, D.G., 1997. Fungi: hyphomycetes. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London, UK, pp. 213-249.
- Hu, G., Leger, R. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6383 – 6387.
- Hu, Q., Ren, S., An, X., Qian, M. 2007. Insecticidal activity influence of destruxins on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology*. 131: 262-268.
- James P, Kershaw M, Reynolds S, Charmley A, 1993. Inhibition of desert locust (*Schistocerca gregaria*) Malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal Insect Physiology*. 39: 797-804.
- Kaaya, G.P., Munyinyi, D.M. 1995. Bicontrol potencial of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp) at developmental sites. *Journal Invertebrate Pathology*. 66: 237-241.
- Kabaluk, J. Ericsson, J. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal* 99: 1377-1381.
- Kang, C.S., Goo, B.Y., Gyu, L.D., Heon, K.Y. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alteraria solani*. *Korean Journal of Mycology* 24: 49-55.
- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D, 2012. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breed*. 3: 63-79.
- Kim, J., Goettel, M., Gillespie, D. 2007. Potencial of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control* 40: 327-332.
- López-Escudero, F., Mercado-Blanco, J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344:1-50.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I., Onilyde. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus*

- brevis* OG1. African Journal of Biotechnology 2: 219-227
- Oller-Lopez, J., Iranzo, M., Moreneo, S., Oliver, E., Cueva J., Oltra, J. 2005. Bassianolone: an antimicrobial precursor of cephalosporolides E and F from the entomoparasitic fungus *Beauveria bassiana*. Org Biomol Chem 3: 1172-1173.
- Ownley, B., Pereira, R., Klingeman, W., Quigley N., Lecide B. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pest and plant pathogens. In: Lartey, R.T., Caesar, A.J. (Eds). Emerging Concepts in Plant Health Management. Res. Signpost, Kerala, India. 255-269 pp.
- Ownley, B., Gwinn, K., Vega, F. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. Biocontrol 55: 113-128.
- Pal, k., Gardener, McSpadden. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. APSnet. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-117-02.
- Prince, H. 1959. Effect of pH on the antifungal activity of Undecylenic acid and its Calcium Salt. Journal of Bacteriology. 78: 788.
- Quesada-Moraga E, Martin-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Álvarez C, 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biol Control. 47:115-124.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Álvarez-Santiago, C., 2006. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Journal Economic Entomology. 99: 1955-1966.
- Ruiz-Sánchez, E., Donnell, M. 2012. Effects of the microbial metabolite destruxin A on ion transport by the gut and renal epithelia of *Drosophila melanogaster*. Arch. Insect Biochemistry. 80: 109-122.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. American Journal of Botany. 99: 101-107.
- Sasan, R., Bidochka, M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp Phaseoli. Canadian Journal of Plant Pathology 35: 288-293.
- Shahid, A., Rao, A., Bakhsh, A., Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. Archive Biology Science Belgrade 64: 21-42.
- Todorov SD, Dicks LMT. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolates from molasses produces bacteriocins active against Gram-Negative bacteria. Enzyme Microbiology and Technology. 36: 318-326.
- Vanninen, I., Hokkanen, H., Tyni-Juslin, J. 1999. Screening of field performance of entomopathogenic fungi and nematodes against cabbage root flies (*Delia radicum* L and *D. floralis* (Fall.); Diptera, Anthomyiidae. Acta Agriculturae Scandinavica. 49: 167-183

- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vega, F., Posada, F., Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46: 72-82.
- Wang, Y., Liu, S., Mao, X., Zhang, Z., Jiang, H., Chai, R., Qiu, H., Wang, X., Li, B., Sun, G. 2013. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 114: 1480-1490.
- Yamada Y., Azuma, K. 1977. Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11: 743-749.
- Zapata S., Muñoz J., Ruiz O., Montoya O., Gutierrez P. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la facultad de Química Farmaceutica*. 16: 75-82.





## V. CONCLUSIONES



1. Las investigaciones realizadas permiten concluir que varios aislados de los géneros fúngicos entomopatógenos *Metarhizium* y *Beauveria* tienen potencial para ser usados en una estrategia integral de control dual en el cultivo del olivo para el manejo de la mosca del olivo, tanto de adultos como de los estados preimaginales (larvas de tercer estadio y puparios), y de los fitopatógenos radiculares *V. dahliae*, *P. megasperma* y *P. inundata* principales limitaciones sanitarias del cultivo.
2. Todos los aislados entomopatógenos evaluados presentaron patogenicidad sobre larvas y adultos de *C. capitata*, afectando en diferentes grados a la supervivencia del insecto. Algunos de estos aislados continuaron su efecto en los adultos que lograron emerger de los puparios tratados, lo cual contribuye a reducir las siguientes generaciones del insecto. Esto indica lo importante que puede ser una estrategia dirigida a aumentar los niveles de estos organismos en los agroecosistemas para el manejo de insectos.
3. En esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto que la capacidad insecticida del ascomiceto mitospórico entomopatógeno *Metarhizium brunneum* EAMb09/01-Su se deriva especialmente de la producción de destruxinas. Se trata, por tanto, de la primera referencia de control de adultos de dos tefritidos de gran importancia económica en España, *Ceratitis capitata* “mosca mediterránea de la fruta” y *Bactrocera oleae* “mosca del olivo” con las destruxinas A y A<sub>2</sub>.
4. Se ha logrado determinar que la actividad fungicida de los aislados EAMb09/01-Su y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* está relacionada principalmente con la producción de metabolitos secundarios con pesos moleculares menores a 3500 Da y altamente polares. Estos metabolitos tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento micelial y la

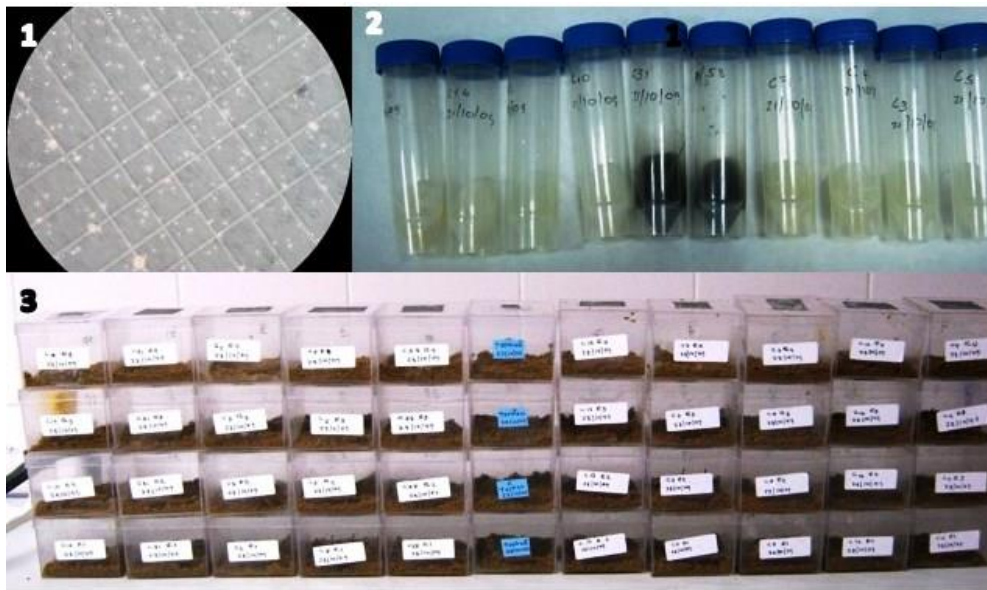


germinación de los propágulos de *V. dahliae* y de *Phytophthora* spp., además de disminuir los síntomas de la Verticilosis en plantas de algodón inoculadas con *V. dahliae*.

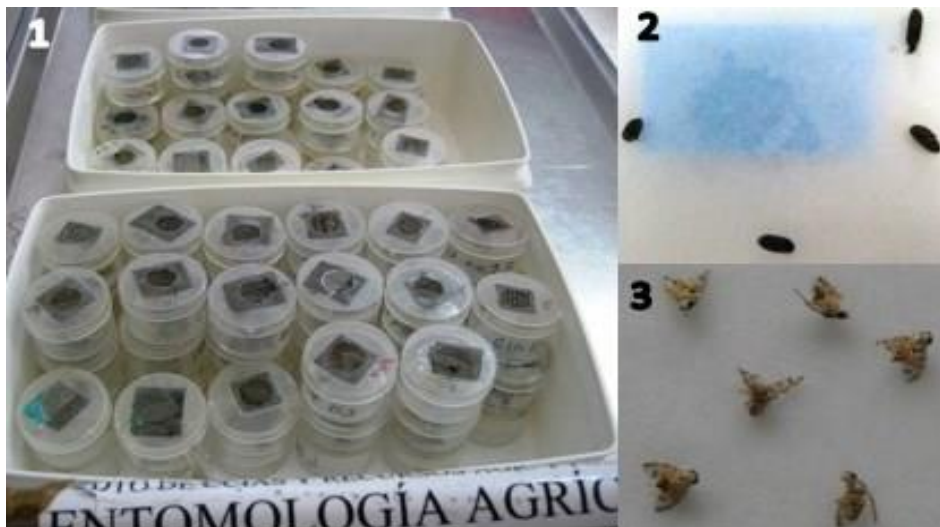
5. Con el aislado EAMb 09/01 de *M. brunneum* es posible generar productos de alta eficacia contra tefrítidos teniendo en cuenta su rápida acción contra los organismos diana y su estabilidad a condiciones ambientales adversas como la temperatura y luz ultravioleta. El pH, en cambio, debe ser regulado para optimizar su eficacia.
6. Finalmente, el grupo de investigación considera que los metabolitos secundarios obtenidos de *M. brunneum* EAMb 09/01-Su representan una alternativa sostenible para el control de tefrítidos y de los fitopatógenos *V. dahliae* y *P. megasperma*. El desarrollo una estrategia que incluya estos metabolitos, puede contribuir a reducir la dependencia de plaguicidas sintéticos, mejorando la sostenibilidad del cultivo del olivo en España. Sin embargo, es necesario profundizar en los estudios a nivel de campo en medianas y grandes extensiones que permitan aprovechar todo el potencial de estos los hongos entomopatógenos.



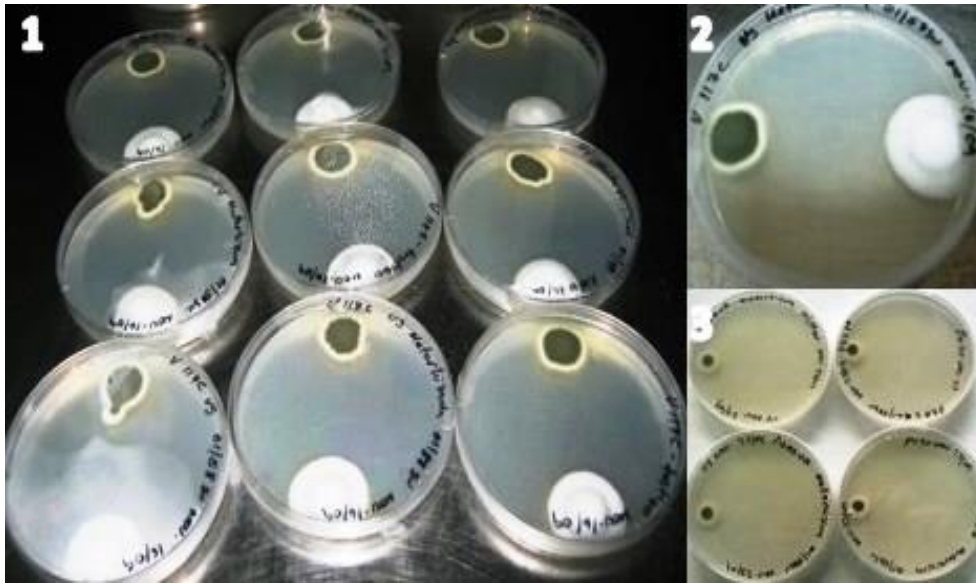
# VI. MEMORIA FOTOGRAFICA



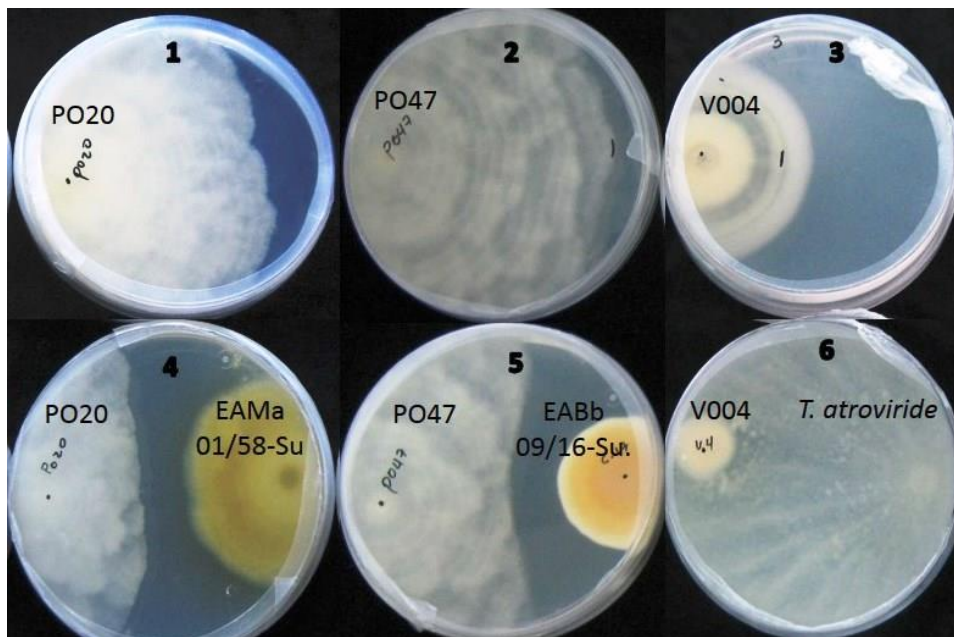
**Proceso de evaluación de hongos entomopatógenos.** 1, conteo de conidios en cámara de Malassez. 2, suspensiones de conidios de diferentes aislados de hongos entomopatógenos. 3, preparación de unidades experimentales para la evaluación de hongos entomopatógenos sobre puparios de *Ceratitidis capitata*.



**Seguimiento del proceso de infección de pre-imaginales de *C. capitata*.** 1, individualización de adultos de *Ceratitidis capitata* emergidos de los tratamientos. 2, puparios tratados con hongos entomopatógenos que no emergieron procesados para cámara húmeda. 3, adultos emergidos de los tratamientos con mortalidad a los 3 días después de emergencia procesados para cámaras húmedas.



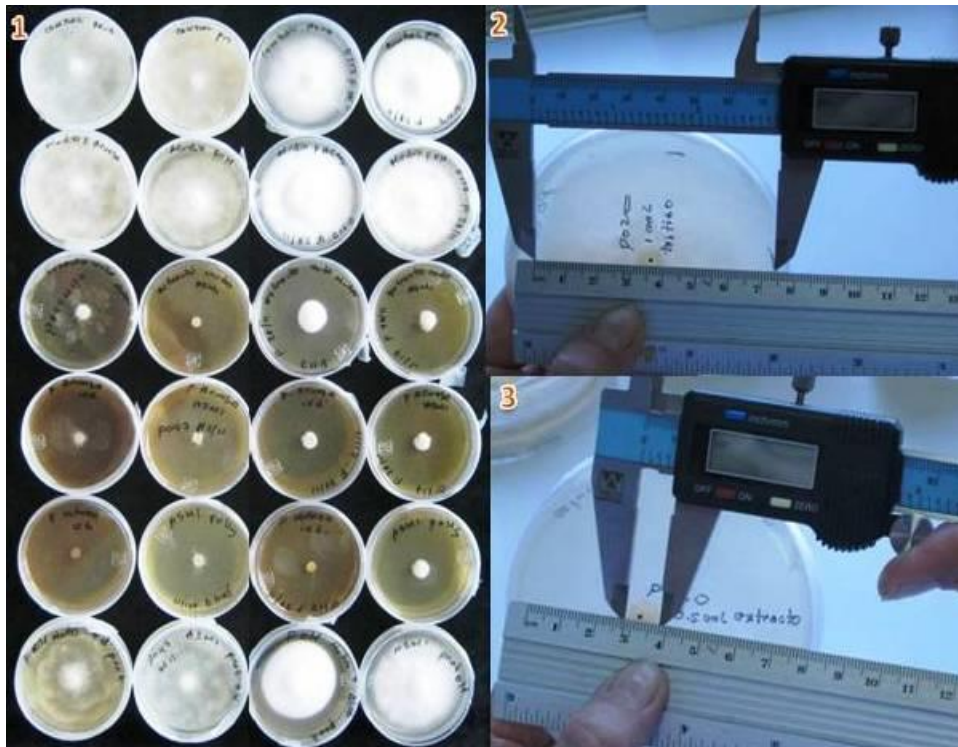
**Test antifúngicos mediante placas de cultivo dual.** 1, Disposición del hongo entomopatógeno y del fitopatógeno en cultivo dual. 2, placas con siembra simultánea. 3, placas precolonizadas por el hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*.



**Resultados del test dual de actividad antifúngica de hongos entomopatógenos.** 1, control *P. megasperma* (PO20), 2, control *P. inundata* (PO47). 3, control *V. dahliae* (V004). 4, formación de halo de inhibición de *P. megasperma* (PO20) frente a *M. brunneum* EAMa 01/58-Su. 5, formación de halo de inhibición de *P. inundata* (PO47) frente a *B. bassiana* EABb 09/16-Su. 6, inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* V004 frente a *T. atroviride* sin formación de halos de inhibición.



**Preparación de extractos de hongos entomopatógenos para pruebas antifúngicas.** 1, cultivos líquidos. 2, retiro de biomasa de cultivos líquidos. 3. Proceso de centrifugado. 4, filtrado al vacío de extractos. 5, concentración de extractos. 6, esterilización por filtración. 7, preparación de tratamientos antifúngicos.



**Metodología para la evaluación de la inhibición del crecimiento micelial con extractos y fracciones orgánicas obtenidas de hongos entomopatógenos.** 1, tratamientos con sus respectivos controles. 2, medición del crecimiento micelial del fitopatógeno en el tratamiento control para calcular el porcentaje de inhibición. 3, medición del crecimiento micelial del fitopatógeno en los tratamientos una vez el patógeno alcanza el borde de la placa en el tratamiento control.

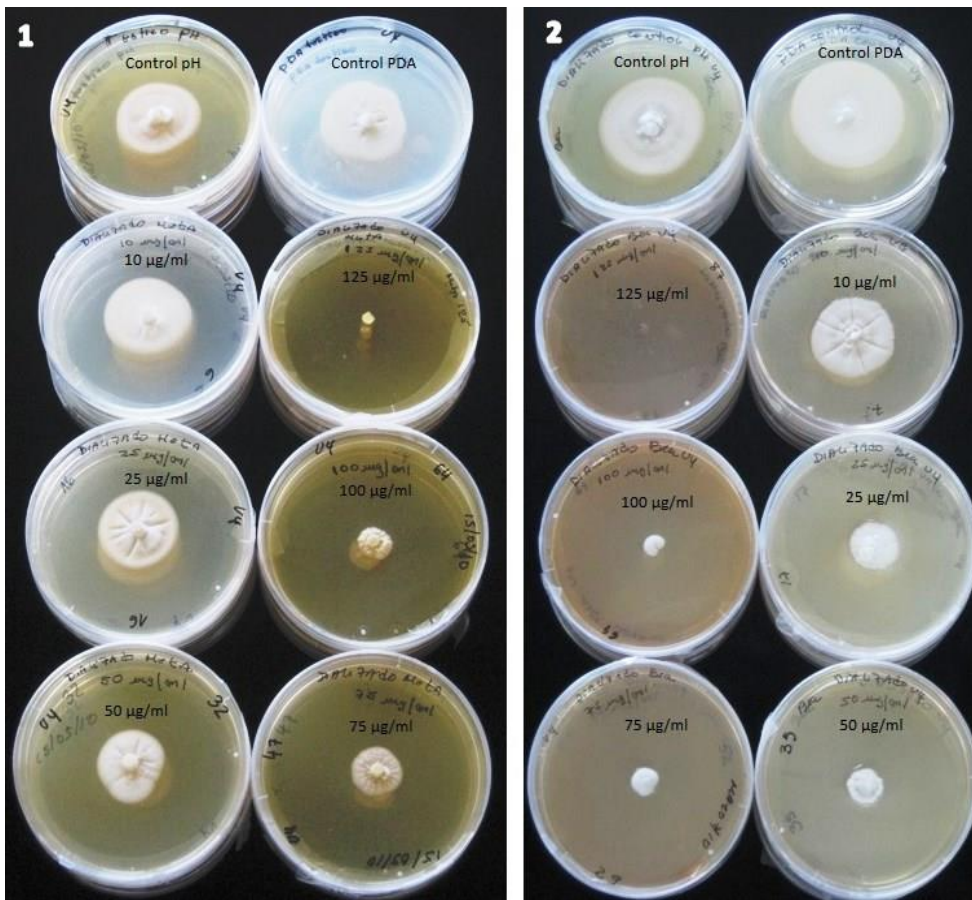


**Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones dializadas y adializadas de hongos entomopatógenos.** 1, proceso de diálisis de extractos crudos en agua destilada (1:20) 48 horas, con recolección la solución dializada cada 24 horas. 2, aspecto de las fracciones obtenidas luego del proceso de esterilización por filtración. 3, preparación de tratamientos en medio de cultivo PDA a 50 °C. 4, proceso de dispensado de 15 ml de tratamiento en placas Petri (4 placas por tratamiento). 5, siembra de los fitopatógenos en el centro de la placa para evaluar crecimiento micelial, 6, crecimiento micelial del aislado V117 de *V. dahliae* en las fracciones dializadas y adializadas obtenidas de hongos entomopatógenos. 7, incubación de conidas de *V. dahliae* en las fracciones dializadas. 8, siembra de conidas tratadas en medio de cultivo agar-agua. 9 Test de evaluación de germinación de conidas tratadas.

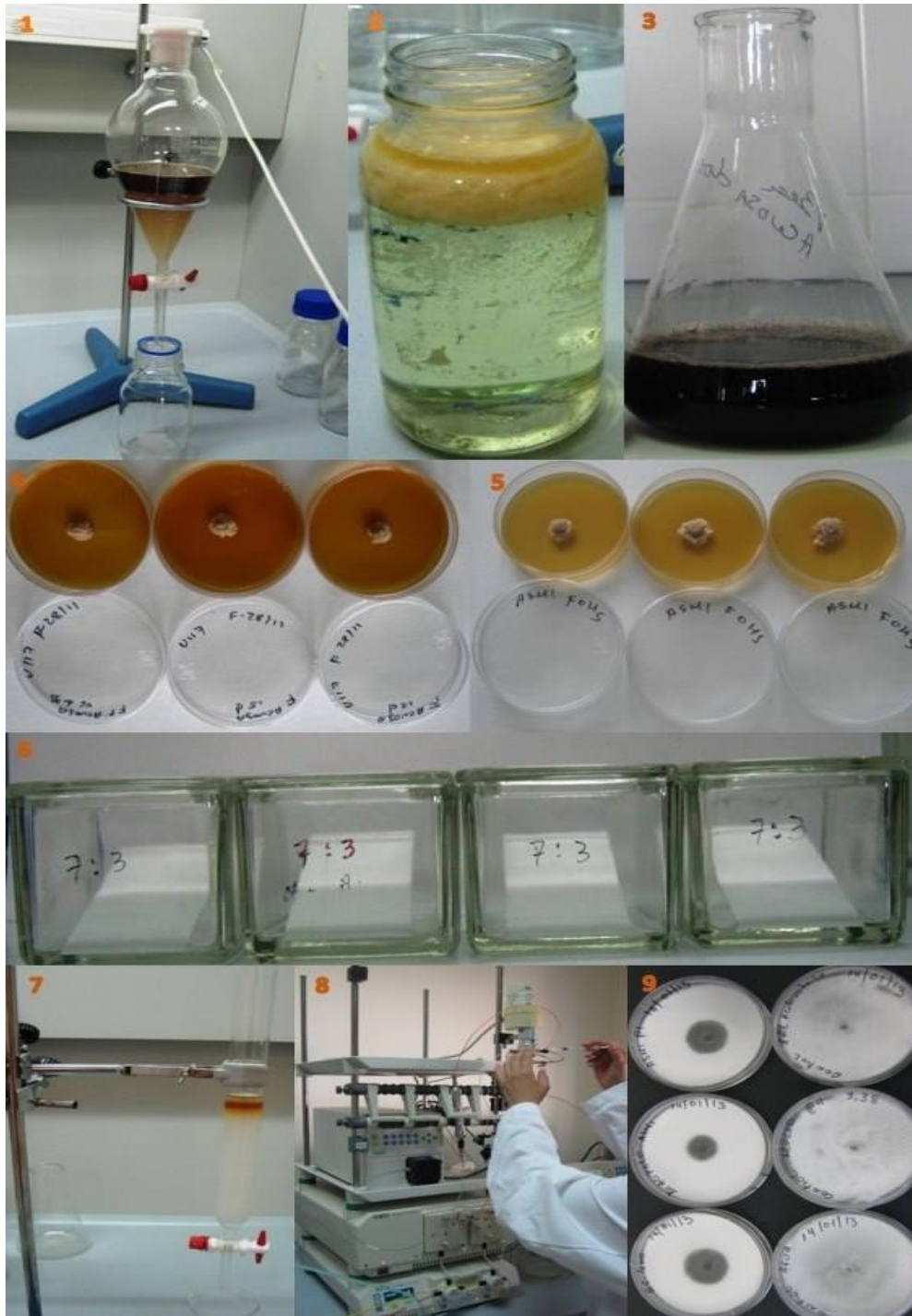


**Evaluación de tratamientos (extractos y fracciones orgánicas sobre microesclerocios de *V. dahliae*.** 1, microesclerocios de *V. dahliae* en medio de cultivo PDA. 2, producción masiva de microesclerocios en medio AMA (arena: harina de maíz: agua). 3, suelo artificialmente infestado e incubado con los tratamientos, 4, Filtrado del suelo a través de tamices de 150 y 35 micras, 5, fracción de suelo retenida en tamiz de 35 micras, 6, matraces conteniendo el suelo procesado para la siembra. 7. siembra de un ml de la suspensión de suelo en medio APSM. 8, placas incubadas después de la siembra durante 15 días a 22°C. 9, placas procesadas (lavadas), para el conteo de la germinación de microesclerocios de *V. dahliae*

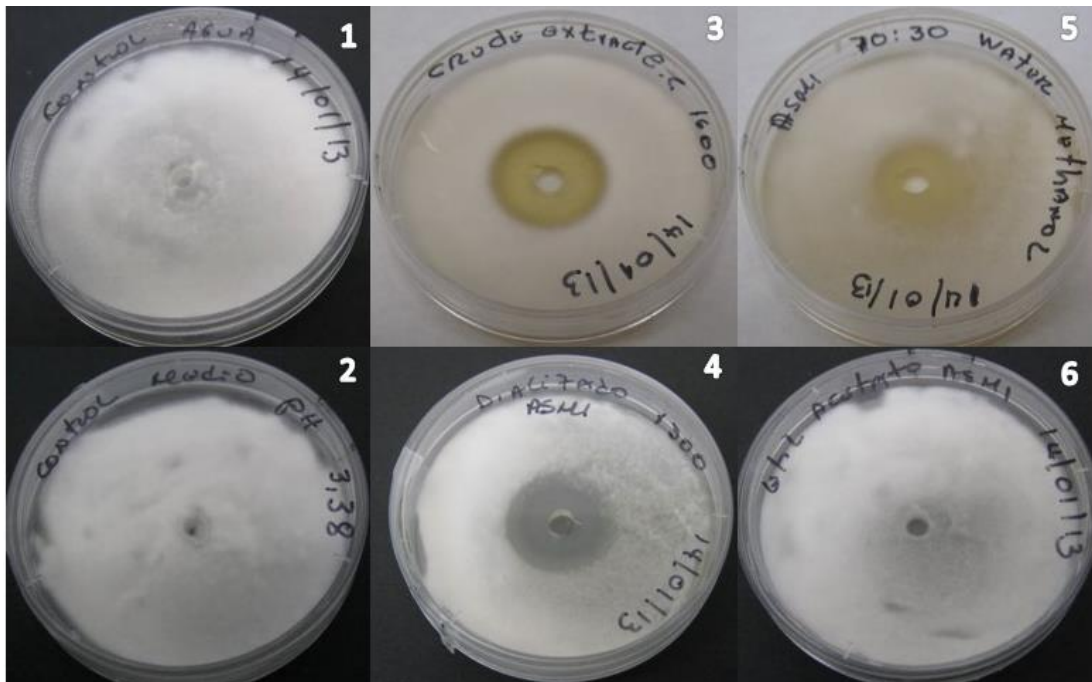




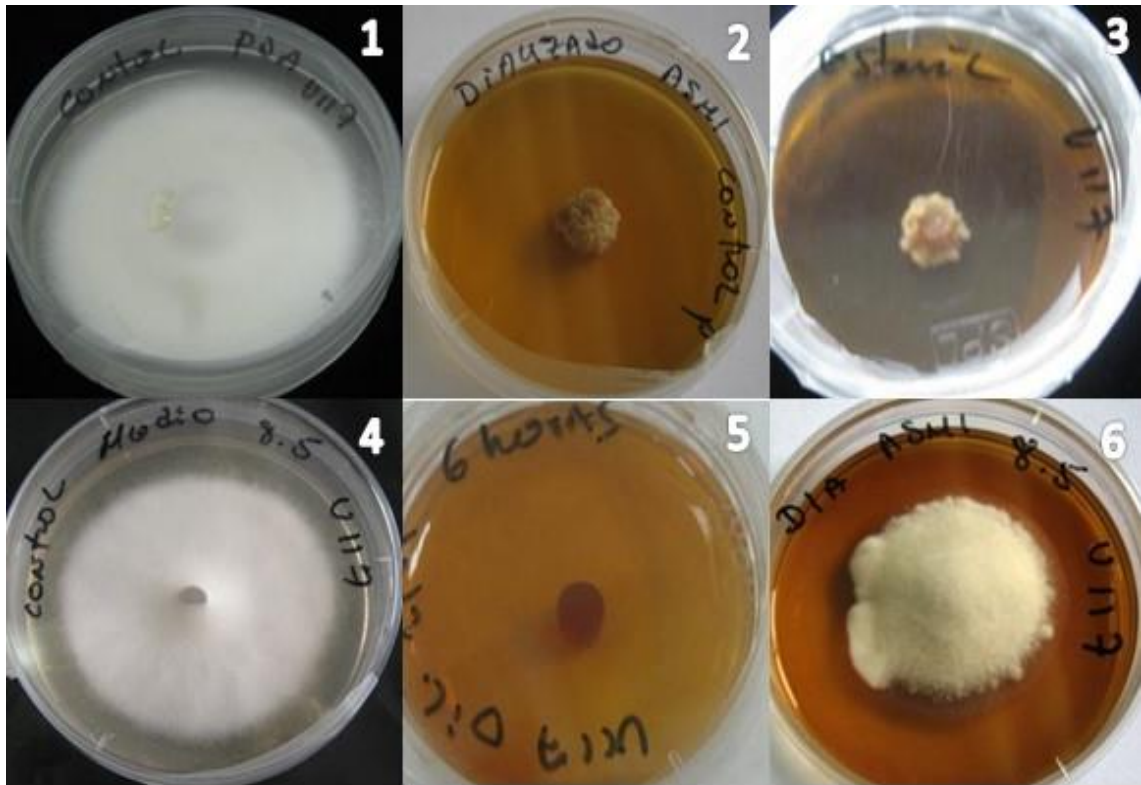
**Efecto de diferentes concentraciones de la fracción dializada de hongos entomopatógenos sobre crecimiento micelial de *V. dahliae* V004.** 1, fracción dializada obtenida de *M. brunneum*. 2, fracción dializada obtenida de *B. bassiana*. La concentración expresada en µg de proteína/ml



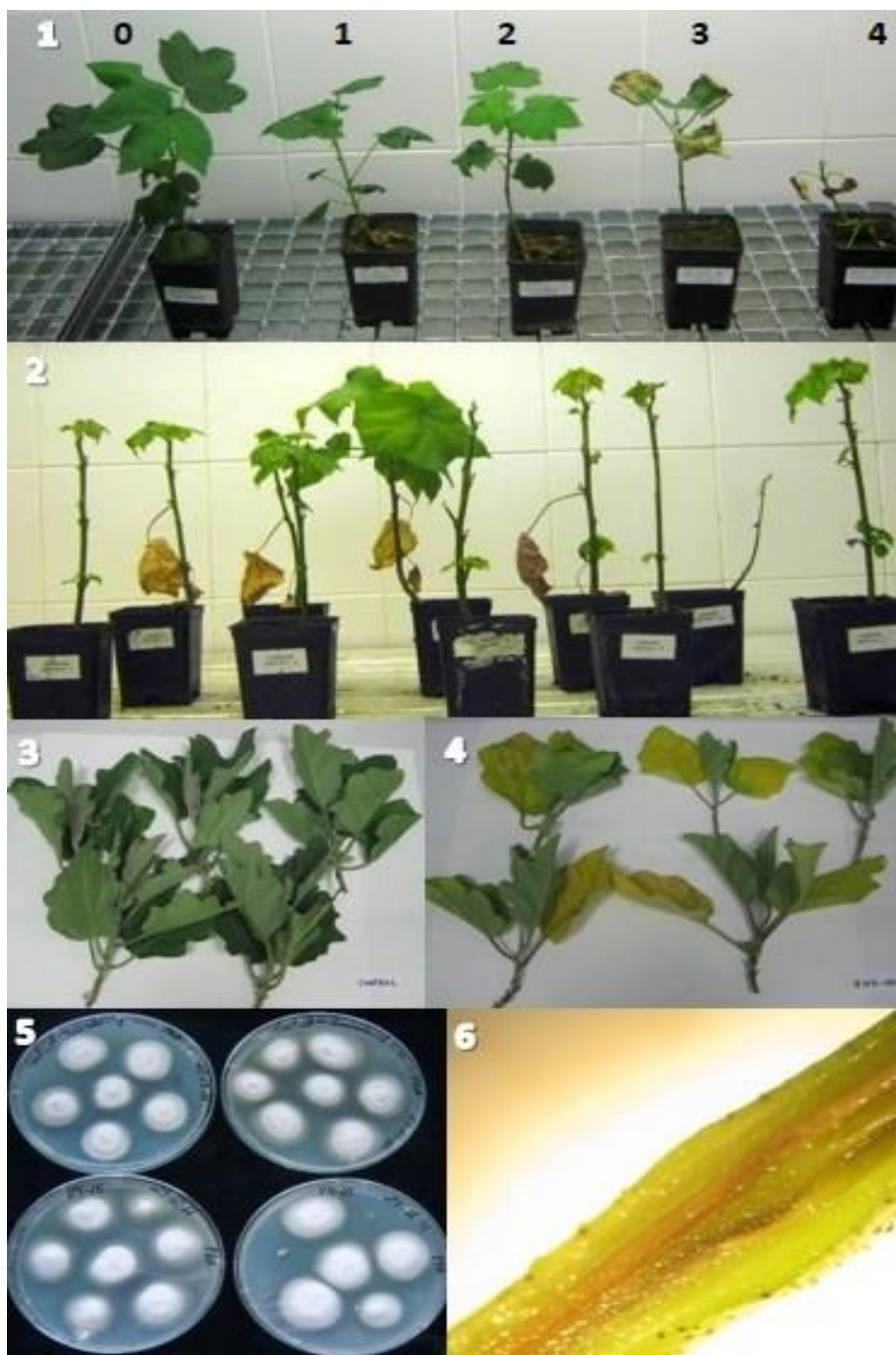
**Anexo 8. Fraccionamiento orgánico de la fracción dializada de *M. brunneum* EAMb09/01-Su.** 1, extracción con cloroformo, 2, fracción clorofórmica. 3, fracción acuosa clorofórmica. 4 y 5 evaluación de las fracciones orgánicas sobre el crecimiento micelial de *V. dahliae*. 6, cromatografía de capa delgada para determinar los eluyentes. 7, cromatografía de columna con sílica gel. 8, fraccionamiento mediante HPLC. 9, metodología de evaluación de las fracciones semipuradas sobre el crecimiento micelial de *V. dahliae*.



**Test de actividad fungicida del extracto crudo y las fracciones orgánicas de *M. brunneum* EAMb 09/01 obtenidas por cromatografía de columna.** 200  $\mu$ l de una suspensión de  $10^6$  conidias/ml de *V. dahliae* fueron sembradas sobre las placas Petri de 6 cm de diámetro conteniendo PDA. El centro de la placa fue perforado con un sacabocados de 0.6 mm de diámetro, en la perforación fueron colocados 50  $\mu$ l de la fracción a evaluar. Control agua estéril (1). Control medio de cultivo fraccionado con EtOAc:2-propanol (2). Extracto crudo (3). Fracción dializada (4). Fracción H<sub>2</sub>O:MeOH (7:3 v/v) (5). Fracción EtOAc:2-propanol 1:9 v/v (6).



**Efecto de la temperatura, la luz UV light y el pH sobre la actividad fungicida de la fracción dializada de *M. brunneum* EAMb 09/01-Su.** 1, crecimiento micelial normal de *V. dahliae* en PDA (control negativo), 2, crecimiento micelial anormal de *V. dahliae* en PDA mezclado con el 25% de la fracción dializada (control positivo). 3, crecimiento micelial anormal de *V. dahliae* en PDA mezclado con 25% de la fracción dializada tratada a 120°C por 20 min. 4, crecimiento micelial normal de *V. dahliae* en PDA mezclado con 25% de G<sub>40</sub>P<sub>20</sub> ajustado a pH 8.5. 5, crecimiento micelial anormal de *V. dahliae* en PDA mezclado con 25% de la fracción dializada tratada con 6 h de luz UV. 6, crecimiento micelial de *V. dahliae* en PDA mezclado con 25% de la fracción dializada tratada a pH 8.5.



**Desarrollo de la Verticilosis en plantas.** 1, escala para la medición del progreso de la Verticilosis en plantas (0-4). 2, plantas de algodón afectadas por *V. dahliae*. 3, plantas de sanas de berenjena. 4, plantas de berenjena afectadas por *V. dahliae*. 5, pruebas de Koch realizadas a las plantas inoculadas con *V. dahliae* luego del muestreo destructivo. 6, tejidos de algodón afectados por *V. dahliae*.