

## RESUMEN

El primer objetivo de este trabajo fue aislamiento cepas de hongos entomopatógenos a partir de suelo de olivar de Andalucía (España). El método de la "trampa *Gallería*" permitió identificar y aislar dos especies de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok a partir del 21 de las 28 (75%) muestras de suelos de olivar recogidas en el presente trabajo por Andalucía, España. La especie dominante fue *B. bassiana*, aislada en 16 (57.2%) de las muestras de suelo, mientras que *M. anisopliae* apareció en 6 de ellas (21.4%). Por otro lado, se observó que la mortalidad en larvas de *G. mellonella* provocada por *B. bassiana* presentaba variación según las características físico-químicas del suelo y el sistema de manejo del mismo, así los valores más elevados se dieron en suelos de textura franca y pH ácidos, con contenido de materia orgánica >3.64% y con cubierta vegetal. Cuando analizamos conjuntamente los resultados de las 28 muestras recogidas en el presente trabajo, con los de las 32 recogidas con anterioridad por nuestro grupo de investigación, se observó que tanto la frecuencia de aparición de hongos entomopatógenos en general, como la de cada especie en particular mantienen idéntico orden de magnitud. Así los hongos entomopatógenos estaban en 42 de las 60 (70.0 %) muestras de suelo, *B. bassiana* apareció en 37 (61,7%) y *M. anisopliae* en 14 (23,3%). Además la presencia de *B. bassiana* fue relacionada con las características físico-químicas del suelo e igualmente la mayor frecuencia se dio en los de textura franca, pH ácidos y contenido de materia orgánica alto (>3.64%). El segundo objetivo de este trabajo fue seleccionar aislados de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* patogénicos frente a pupas de la mosca del olivo

*Bactrocera oleae* (Gmelin) (Díptera: Tephritidae), pero dado el poco rendimiento de nuestra población mantenida en laboratorio, se tomó como modelo la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wied.), que pertenece a la misma familia, Tephritidae, y cuyas pupas (puparios) presentan un alto grado de similitud. En el primer bioensayo hemos evaluado la patogenicidad de 45 aislados fúngicos, 32 de *Beauveria bassiana* y 13 de *Metarhizium*, a la dosis de  $1.0 \times 10^8$  conidias/ml aplicada a un suelo estéril bajo humedad constante (-0.01 MPa 9% p/v) y 25°C de temperatura. Todos los aislados fueron patogénicos, con mortalidades que oscilaron entre el 3.3 y el 73.3 %, los correspondientes de *M. anisopliae* causaron porcentajes superiores a los de *B. bassiana* y los de tres de aquéllos, EAMa 01/158-Su, EAMa 00/19-Su y EAMa 01/26-Su, oscilaron entre el 53.3 y 73.3%. En el segundo bioensayo, se estudió el efecto de la humedad del suelo y de la dosis en la virulencia de los 3 aislados de *M. anisopliae*, seleccionados en el ensayo anterior, EAMa 00/19-Su, EAMa 01/26-Su y EAMa 01/158-Su. Se aplicaron al suelo estéril a tres dosis,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$  y  $1.0 \times 10^8$  conidias/ml, cada una bajo tres regímenes distintos de humedad en el suelo -0.1, -0.01 y -0.0055 MPa y a 25 °C de temperatura. Los valores mortalidad por micosis de los tres aislados evaluados fueron muy bajos a las dosis de  $1.0 \times 10^6$  y  $1.0 \times 10^7$  conidias/ml, no sobrepasaron el 26.7%. Se observó que el aislado EAMa 01/158-Su, fue más virulento a la dosis de  $1.0 \times 10^8$  conidias/ml bajo todas las condiciones de humedad, causó mortalidades que oscilaron entre el 63.3 y 76.7%, por lo que fue seleccionado para el objetivo siguiente. Por otro lado, el alto porcentaje de mortalidad de adultos emergidos de los suelos tratados, 40%, fue originado por el aislado EAMa 01/26-Su. En el último ensayo, determinamos el efecto de la temperatura y humedad en el suelo sobre la virulencia del aislado EAMa 01/158-

Su por aplicación de una dosis,  $1.0 \times 10^8$  conidias/ml, bajo 5 condiciones de temperatura (15, 20, 25, 30 y 35°C), y para cada una tres regímenes de humedad -0.1, -0.01 y -0.0055 MPa. Los valores de mortalidad causada por el aislado aumentaron en relación directa con la temperatura, siendo máximos a 25°C y 30°C. Por otro lado, los valores de mortalidad por micosis en cada temperatura estuvieron en relación inversa con el contenido de humedad en el suelo, el valor máximos 76.6% se alcanzó a la temperatura 30°C y -0.1 MPa de humedad. Estos resultados ponen en evidencia que la biodiversidad de Hongos Entomopatógenos en los suelos de olivar se reduce a dos especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* no obstante se descubre una elevada diversidad en virulencia lo cual representa un alto potencial para su empleo en el control biológico de *Bactrocera oleae*.

**Palabras claves:** Control biológico, aislamiento, hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, olivo, trampa de *Gallería*, Tephritidae, mosca del olivo, *Bactrocera oleae*, mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*, pupa, temperatura, humedad, virulencia.

## Summary

The first objective of this work has been to isolate Entomopathogenic Fungi from the soil from olives crops around Andalusia (Spain). By using the *Galleria bait* method, we identified two fungal species, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from 21 (75%) out of a total of 28 soil samples from different Andalusia olive orchards. *Beauveria bassiana* was the most frequently isolated species as it was obtained from 16 (57.2%) soil samples, while 6 soil samples harboured *M. anisopliae* (21.4%). It was observed that mortality of *Galleria mellonella* larvae in the *Galleria bait* method caused by *B. bassiana* depended on both soil abiotic factors such as texture, pH and organic matter content and the management system; thus the highest mortality values occurred in soils of loam texture, lower pH, content of organic matter >3.64% and with natural covers. When we analyzed the results of 28 soil samples collected in the present work together with results of 32 soil samples collected before by our research group, it was observed that both general isolation frequencies and isolation frequencies of each species were similar to those described above for 28 collected in this work. Thus, entomopathogenic fungi were isolated from 42 out of 60 soil samples (70.0%), with *B. bassiana* appearing in 37 (61.7%) and *M. anisopliae* in 14 (23.3%) of them. Moreover, the presence of *B. bassiana* was related to the physic-chemical characteristics of soil, being most frequently isolated from soils with loam texture, acid pH and high content of organic matter (> 3.64%). The second objective of this work was to select *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates pathogenic against puparia of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae), but given the low performance of our

laboratory reared population, puparia from the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.) belonging to the same family were used as model. In a first series of bioassays, we assayed the pathogenicity of 45 fungal isolates, 32 of *Beauveria bassiana* and 13 of *Metarhizium anisopliae* against *C. capitata* puparia treated as late third instar larvae in sterilized soil at a dose of  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml at 25°C and -0.01 MPa (9% p/p) moisture conditions. All isolates were pathogenic against puparia, with mortalities ranging from 3.3 to 73.3%, whereas in general, *M. anisopliae* isolates caused higher mortality rates than those of *B. bassiana*. The three more virulent isolates were all from *M. anisopliae*, EAMa 01/158-Su, EAMa 00/19-Su and EAMa 01/26-Su, with mortality rates ranging from 53.3 to 73.3%, which were selected for the next trial. In a second bioassay series, we studied the effect of soil moisture and dosage on virulence of these 3 isolates (EAMa 00/19-su, EAMa 01/26-su and EAMa 01/158-su) at doses of  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ , and  $1 \times 10^8$  conidia/ml and three soil moisture conditions -0.1 (5% p/p), -0.01 (9% p/p) and -0.0055 MPa (13% p/p) at 25°C. Puparia mortality rates at  $1.0 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml were very low as they did not rise above 26.7%. Isolate EAMa 01/158-Su was shown to be the most virulent at  $1.0 \times 10^8$  conidia / ml under all soil moisture conditions, causing 63.3 to 76.7% mortality rates and it was selected to the next trial. However, the higher mortality of adults coming from treated puparia was caused by EAMa 01/26-Su isolate. In the last bioassay series, we studied the effect of temperature and soil moisture on the virulence isolate EAMa 01/158-Su against fruit fly puparia at a dose of  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml under five temperatures 15, 20, 25, 30 and 35°C, and three moisture regimes -0.1 (5% p/p), -0.01 (9% p/p) and -0.0055 MPa (13% p/p), in which case, mortality rates increased in direct relation with the temperature in the range of

10-30°C, being higher at 25 and 30°C. In addition, for each temperature, mortality was inversely related to soil water content higher, with the higher rate, 76.7%, observed at 30°C and -0.1 (MPa). These results demonstrate the richness of soils from olive crops from Andalusia (Spain) in entomopathogenic fungi isolates even in the diversity of species is reduced to *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The high number of isolates obtained in our work allowed us detecting also a wide range of fungal virulence against puparia, which has provided a candidate isolate for developing a mycoinsecticide for use in biological control of *Bactrocera oleae*.

**Key words:** Biological control, isolation , Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, olive, *Galleria bait*, Tephritidae, olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, Mediterranean fruit Fly, *Ceratitis capitata*, puparia, temperature, soil moisture, virulence .