



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

**Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo
entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control de plagas**

Tesis presentada por D. Alex Eliesser Ríos Moreno para optar por el grado de Doctor por
la Universidad de Córdoba

Fdo. Alex Eliesser Ríos Moreno

V°B° del Director

Fdo. Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga

Catedrático de Universidad

E.T.S.I.A.M.

V°B° de la Codirectora

Fdo. Dr. Dña. Inmaculada Garrido Jurado

Investigadora Juan de la Cierva

E.T.S.I.A.M.

Universidad de Córdoba

Córdoba, julio de 2017

TITULO: *Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo entomopatógeno Metarhizium spp. para el control de plagas*

AUTOR: *Alex Eliesser Ríos Moreno*

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

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



TÍTULO DE LA TESIS: Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control de plagas.

DOCTORANDO: ALEX ELIESSER RÍOS MORENO

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

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

INFORMAN: que el trabajo titulado “Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control de plagas” realizado bajo nuestra dirección por **D. Alex Eliesser Ríos Moreno**, lo consideramos ya finalizado y se han completado con éxito todos los objetivos planteados en dicho trabajo de investigación.

Que dicha Tesis Doctoral se va a presentar como compendio de publicaciones, las cuales se indican a continuación:

Ríos-Moreno A, Carpio A, Garrido-Jurado I, Arroyo-Manzanares N, Lozano-Tovar MD, Arce L, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Quesada-Moraga E. 2016. Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. Biocontrol Science and Technology. 26: 1298-1311. Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en “Entomology”.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains

during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. Biocontrol Science and Technology. 26: 1574-1585. Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology".

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Raya-Ortega MC, Quesada-Moraga E. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*. Journal of Invertebrate Pathology. En prensa DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007. Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en "Zoology".

Ríos-Moreno A, Quesada-Moraga E, Garrido-Jurado I. Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae). Journal of Pest Science. Aceptado con "Major Revision" el 19 de mayo de 2017. Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en "Entomology".

Por todo ello, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, julio de 2017



Fdo.: Dr. D. Enrique Quesada Moraga



Fdo.: Dra. Dña. Inmaculada Garrido Jurado

TESIS PRESENTADA POR COMPENDIO DE ARTÍCULOS

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

Ríos-Moreno A, Carpio A, Garrido-Jurado I, Arroyo-Manzanares N, Lozano-Tovar MD, Arce L, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Quesada-Moraga E. 2016. Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology*. 26: 1298-1311. Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology".

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*. 26: 1574-1585. Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology".

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Raya-Ortega MC, Quesada-Moraga E. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*. *Journal of Invertebrate Pathology*. En prensa DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007. Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en "Zoology".

Ríos-Moreno A, Quesada-Moraga E, Garrido-Jurado I. Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae). *Journal of Pest Science*. Aceptado con "Major Revision" el 19 de mayo de 2017. Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en "Entomology".

El Doctorando



Fdo.: Alex Eliesser Ríos Moreno

SE ES buena gente, SE ES

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer sinceramente al Prof. Dr. Enrique Quesada Moraga y la Dra. Inmaculada Garrido Jurado, por su asesoría, esfuerzos, orientación, paciencia y por sus conocimientos transmitidos para mi formación durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Gracias por haber sido excelentes directores.

Un especial agradecimiento a las instituciones de Panamá: Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU) y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por la beca doctoral otorgada dentro del programa de becas doctorales IFARHU-SENACYT.

Merly, esposa mía, mi enorme gratitud por ese apoyo constante, por tomarme de la mano cada vez que precisaba y ayudarme a superar diversos inconvenientes, pero sobre todo por alegrar cada momento de mi vida. Gracias Amor.

A mis hijos el más sentido agradecimiento por ser los principales impulsores en mi vida. Owen Fernando por tus constantes palabras de motivación y porque has sido el más fuerte durante estos años. Naim por la comprensión y lo que has tenido que sacrificar durante este tiempo a la distancia. Los amo mis chavales.

A mis padres, Alex Fernando y Marta Isabel, por el apoyo, guía, consejos y amor incondicional de siempre, por desear y anhelar continuamente lo mejor para mi vida.

A mis hermanas, Krisly y Shirley gracias por estar siempre ahí, desde cualquier parte del mundo, para escucharme y dar constantemente apoyo.

A Oscar Martínez, que desde el inicio de esta experiencia en Panamá hemos compartido. Gracias amigo.

A la Dra. Lourdes Arce del departamento de Química Analítica y su grupo de trabajo, especialmente a Azahara Carpio y Natalia Arroyo. Gracias por todo.

Muchas gracias A la Unidad de Espectrometría de Masas de la UCO, especialmente a Isabel y Fernando.

A mis amigos (as) del laboratorio: Gloria, María, María Victoria, Meelad, Natalia, Sandra y Silvia por crear un ambiente de trabajo inmejorable. Gracias a Carlos y Lola por su colaboración.

Adrián, Carmen, Dani y Enrique Aranda, mil gracias por dar siempre el apoyo, pero sobre toda por su amistad.

Los buenos amigos perduran, sin importar la distancia: Alejandro, Ander, Amado, Jaime, Oriana, Ramón, Ricardo. Gracias por tan buenos momentos.

Muchas gracias por la valiosa colaboración al Dr. Hanni Kasim y María del Carmen Raya Ortega.

Gracias por el apoyo y confianza a Arturo Jiménez Frías y Pedro Ríos (Tío peyo).

A Flia Palma, Virgilio y Luz (Tía baby), por animar siempre.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos en Panamá, por constantemente estar pendiente y dando siempre positivismo, especialmente a los grupos (Antonia e hijos, amigos para toda la vida, Flia Moreno y biochiricanos).

Agradezco a Dios por todos estos años.

RESUMEN

La agricultura ha provisto de alimentos al ser humano desde su origen, pero en el último siglo, la producción agraria se ha intensificado gracias, entre otros, al empleo de insecticidas. Sin embargo, esta intensificación no ha estado exenta de problemas de contaminación por residuos en los alimentos o de efectos negativos sobre la biodiversidad y el medioambiente. La legislación agraria actual promueve una agricultura acorde con la creciente preocupación de los consumidores por la salud y por el medioambiente. En este escenario, el desarrollo de estrategias ambientalmente sostenibles y seguras para los consumidores se sitúa en primera línea en los programas de investigación para el control de plagas. Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs) y en particular el género *Metarhizium*, cumplen los requisitos de seguridad para el ser humano y el medio ambiente y además han mostrado un gran éxito en el control de plagas de insectos debido a su modo de acción por contacto, su presencia natural en diversos ecosistemas y su capacidad de secretar compuestos con actividad insecticida. No obstante, la implantación en el mercado de los micoinsecticidas es lenta, y tropieza con una barrera fundamental que es la escasa información sobre el destino de algunos metabolitos secundarios en la cadena alimentaria y su riesgo para la salud humana y animal, información clave para abordar su registro. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar y validar métodos analíticos con alta sensibilidad para su determinación a bajas concentraciones en diferentes matrices biológicas. La destruxina A es uno de los principales metabolitos secundarios producidos por el AME *Metarhizium* spp., pero la falta de estudios sobre su producción por parte del hongo es probablemente el mayor obstáculo para el registro de nuevas cepas de esta especie fúngica. El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar nuevas herramientas para la detección y cuantificación de destruxinas, así como investigar el destino de la destruxina A en la cadena trófica.

En el capítulo II de esta Tesis, se ha determinado la producción de destruxinas por parte de cuatro cepas de *Metarhizium* (BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, ARSEF 23 y ART 2825) con un método mejorado de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas (UHPLC-MS / MS) en cuatro medios de cultivo (CM, MM, CN₂, OSM) que representan diferentes condiciones de estrés. Cada 3 días durante 18 días se tomaron muestras para análisis que permitieron detectar 15 destruxinas, siendo las

destruxinas A y B las más abundantes. Además, se detectaron diferencias significativas entre las cepas en la producción de destruxinas, que a su vez fue altamente dependiente del medio de cultivo.

En el capítulo III la colonización endofítica y la producción de destruxina A en plantas de patata se monitorizaron a las 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la inoculación con dos cepas de *Metarhizium brunneum* Petch. (BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su), lo que puso de manifiesto que la concentración de destruxina A en los tejidos vegetales es muy baja en comparación con los niveles de colonización. Aunque se observó una colonización similar para ambas cepas, hubo diferencias a lo largo de la planta, con valores más altos en las hojas a 96 h para EAMa 01/58-Su (83.3 %) y BIPESCO5 (81.6 %), y más bajos en tubérculo y raíz a las 72, 96 y 120 h después de la inoculación para ambas cepas (10.0-13.3 %). Para la cepa EAMa 01/58-Su, la destruxina A se cuantificó a las 24 h en el tubérculo y la raíz (2.0 ± 1.4 y 2.49 ± 1.7 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectivamente) y a las 96 h con igual concentración también en tubérculo y raíz (2.5 ± 1.7 $\mu\text{g} / \text{kg}$); para BIPESCO5, solamente se cuantificó destruxina A en el tubérculo a las 24 h y en la raíz a las 48 h (6.8 ± 4.8 y 2.1 ± 1.4 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectivamente).

En el capítulo IV se investiga por primera vez la dinámica de crecimiento de las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* y la secreción de destruxina A durante el proceso de infección de larvas del insecto modelo *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae). Se observó que la secreción de destruxina A fue paralela a la evolución de la cantidad de ADN fúngico en el interior del insecto para la cepa EAMa 01/58-Su, no así para BIPESCO5. Las cepas EAMa 01/58-Su y BIPESCO5 secretaron destruxina A desde los días 2 al 6 y desde el día 2 hasta el día 5 después del tratamiento, respectivamente. Para EAMa 01/58-Su y BIPESCO5, la máxima cantidad de destruxina A producida en el insecto hospedante fue de 0.369 y 0.06 $\mu\text{g}/\text{larva}$ a los 4 días del tratamiento, respectivamente, y a lo largo del proceso patogénico, la producción fue de 0.6 y 0.09 $\mu\text{g} / \text{larva}$, respectivamente.

En el capítulo V se realizaron bioensayos presa-depredador para evaluar el comportamiento y la supervivencia de las larvas del depredador generalista *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera; Chrysopidae) al alimentarse con larvas insecto polífago *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera; Noctuidae) inoculadas con las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su. Además, se llevaron a cabo estudios ecotoxicológicos para supervisar el

destino de la destruxina A en el sistema presa-depredador. La concentración máxima de destruxina A producida por la cepa BIPESCO5 fue el día 4 con un valor de 0.000054 µg/insecto (aproximadamente 0.014 µg/g) y para la cepa EAMa 01/58-Su el día 5 con 0.00012 µg/insecto (aproximadamente 0.031 µg/g), mientras que el metabolito no se detectó en larvas de *C. carnea*. El porcentaje de crisopas que se alimentó de larvas de *S. littoralis* 24 horas después de la infección fue de 96.6, 75.0 y 65.0 % para el control, EAMa 01/58-Su y BIPESCO5, respectivamente, mientras que 5 días después de la infección fue 38.3 % para control y 33.3 % en los tratamientos con las cepas EAMa 01/58-Su y BIPESCO5. La cantidad de larvas de *S. littoralis* consumidas por *C. carnea* 24 h después de la infección fue 5.6, 2.2 y 2.3 para las tratadas con el control, EAMa 01/58-Su y BIPESCO5 respectivamente, mientras que 5 días después de la infección consumió una sola larva *per cápita*. Esto puso de manifiesto que los tratamientos de *M. brunneum* contra las larvas de *S. littoralis* fueron seguros para *C. carnea* debido tanto a la ausencia de mortalidad relacionada con los hongos en el depredador como a la falta de movimiento de la destruxina A de la presa al depredador.

Es importante resaltar que en los capítulos IV y V, para ambas cepas, la mortalidad de las larvas debido a otras causas fue mucho mayor que la mortalidad con crecimiento fúngico. Sin embargo, la secreción de destruxina A fue mayor para EAMa 01/58-Su que para BIPESCO5, lo que sugiere que la destruxina A podría ser un factor de virulencia de la primera, mientras que la segunda podría requerir la participación de otros factores además de destruxina A durante el proceso de infección. Los resultados obtenidos proporcionan métodos analíticos valiosos para llevar a cabo evaluaciones de riesgo sobre el empleo de AME, así como resultados que indican que su empleo supone un bajo nivel de riesgo para la salud humana, animal y medio ambiental.

Palabras clave: Ascomicetos mistospóricos entomopatógenos, *Metarhizium brunneum*, *Metarhizium robertsii*, metabolitos, destruxinas, endofitismo, *Spodoptera littoralis*, *Galleria mellonella*, *Chrysoperla carnea*

ABSTRACT

Agriculture produces the vast majority of the world's food supply, and in last century the global food production has grown at a huge rate mainly from the increased yields resulting from greater inputs of insecticides and other technologies. Meanwhile overuse or improper use of insecticides and other agrochemicals has raised issues about related environment and health costs, with current legislation promoting sustainable agriculture, in which scenario, the development of environmentally sustainable strategies is mandatory for research programs regarding pest control. The entomopathogenic mitosporic ascomycetes (EMAs) and in particular the genus *Metarhizium* have shown great success in the control of insect pests due to their contact mode of action, natural presence in the ecosystems and their ability to secrete compounds with insecticidal activity, and even, they comply with the security requirements for human health and environment, whereas information about the fate of their secondary metabolites in the food chain and their risk to human and animal health is still scarce. There is a need to develop and validate analytical methods with high sensitivity for metabolite determination at low concentrations in different biological matrices. Destruxin A is one of the major secondary metabolite produced by the genus *Metarhizium* spp., but the lack of studies concerning destruxin A production is most likely the biggest obstacle for registration of new fungal strains. The main goal of this research has been to develop new tools for destruxin detection and quantification and to investigate the fate of destruxin A in the trophic chain.

In chapter II, destruxin production for *Metarhizium* strains BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, ARSEF 23 and ART 2825 was determined with an improved method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), which has shown high precision in the detection and quantification of destruxins in four culture media (CM, MM, CN₂, OSM) representing different stress conditions. Every 3 days samples were taken for analysis over 18 days that allowed detecting 15 destruxins, with destruxin A and B as the most abundant. However, significant differences among strains in destruxin production were detected, and for each strain, destruxin production was highly dependent on culture medium.

In chapter III, endophytic colonisation and destruxin A production on potato plants were monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h after inoculation with *Metarhizium brunneum* strains (BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su), which showed that the concentration of destruxin A in plant tissues was very low compared to the colonisation levels. Although a similar colonisation was observed for both strains, there were differences in percentages in different parts of the plants, with the higher values occurring in the leaves at 96 h for EAMa 01/58-Su (83.3 %) and BIPESCO5 (81.6 %), and the lower ones, 10.0-13.3 %, observed in tuber and root at 72, 96 and 120 h post-inoculation for both strains. For strain EAMa 01/58-Su, destruxin A was quantified at 24 h (2.49 ± 1.7 and 2.0 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively), and the same concentration was found in both tuber and root at 96 h (2.5 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$); for BIPESCO5, the concentrations differed in tuber at 24 h and in root at 48 h (6.8 ± 4.8 and 2.1 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively).

In chapter IV, the dynamic of fungal growth and secretion of destruxin A by strains BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su of *Metarhizium brunneum* Petch. during the infection process of larvae of the model insect *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) was monitored for the first time. Data showed that destruxin A secretion was parallel to the fungal growth of EAMa 01/58-Su but not coupled with that for BIPESCO5. EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 strains secreted destruxin A from days 2 to 6 and from day 2 to day 5 post treatment, respectively. For EAMa 01/58-Su and BIPESCO5, the maximum titer in the host on day 4 after treatment was 0.369 and 0.06 $\mu\text{g}/\text{larva}$, respectively, and throughout the pathogenic process, the production was 0.6 and 0.09 $\mu\text{g}/\text{larva}$, respectively.

In chapter V, predator-prey bioassays were performed to evaluate the behavior and survival of larvae of the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera; Chrysopidae) when feeding on larvae of the polyphagous pest *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera; Noctuidae) challenged by *M. brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains. In addition, ecotoxicological studies based on HPLC-MS were performed to monitor the fate of destruxin A in the prey-predator system. The maximum concentration of destruxin A produced by the BIPESCO5 strain was on day 4 after treatment with a value of 0.000054 $\mu\text{g}/\text{insect}$ (approx 0.014 $\mu\text{g}/\text{g}$), and for EAMa 01/58-Su was on day 5 with a value of 0.00012 $\mu\text{g}/\text{insect}$ (approx 0.031 $\mu\text{g}/\text{g}$), whereas the metabolite was not detected in *C. carnea* larvae. The percentage of lacewings feeding on *S. littoralis* larvae 24 hour-post infection was 96.6,

75.0, and 65.0 % for the control, EAMa 01/58-Su, and BIPESCO5 treatments, respectively, whereas 5 days-post infection armyworm larvae were consumed by only 38.3 % of the control lacewings and 33.3 % of the EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 treatment groups. *C. carnea* larvae feeding on 24 h-post infection armyworm larvae preyed 5.6, 2.2 and 2.3 larvae for the control, EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 treatments, respectively, whereas those predator larvae feeding on 5 days-post infection armyworm larvae preyed on only one *per capita* larva. It showed that the *M. brunneum* treatments against *S. littoralis* larvae were safe for *C. carnea* due to both the lack of fungus-related mortality in the predator and the lack of movement of destruxin A from the prey to the predator.

Notably in chapters IV and V, in both *M. brunneum* strains, mortality from other causes was higher than mortality with fungal outgrowth. However, destruxin A secretion was higher for EAMa 01/58-Su than for BIPESCO5. These results suggested that destruxin A could be a virulence factor for EAMa 01/58-Su strain, whereas for BIPESCO5, the virulence could require the involvement of other factors as well as destruxin A during the infection process. The results obtained provide valuable analytical methods for carrying out risk assessments on the use of EMAs. In addition, results indicate that their use poses a little potential hazard to human and animal health and the environment.

Keywords: entomopathogenic mitosporic ascomycetes, *Metarhizium brunneum*, *Metarhizium roberstii*, metabolites, destruxins, endophytism, *Spodoptera littoralis*, *Galleria mellonella*, *Chrysoperla carnea*

ABREVIATURAS

AMEs= Ascomycetos Mitospóricos Entomopatógenos

APCI= Ionización Química a Presión Atmosférica “del inglés” Atmospheric Pressure Chemical Ionization

AST= Average Survival Time

BLAST= Basic Local Alignment Search Tool

CE= Collision Energy

CETC= Colección Española de Cultivos Tipo

CM= Complete Medium

CN₂= Carbon Stress Medium

CSR= Cumulative Survival Ratio

DAD= Diode Array Detection

DNA= Deoxyribonucleic Acid

EC= Electroforesis Capilar

EF= Entomopathogenic Fungi

EFSA= Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria “del inglés” European Food Safety Authority

ESI= Ionización Electro Spray “del inglés” Electrospray Ionization

FA= Formic Acid

FAO= Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura “del inglés” Food and Agriculture Organization of the United Nations

FBCAs= Fungal Biological Control Agents

GIP= Gestión Integrada de Plagas

HE= Hongos Entomopatógenos

HPLC= Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento “del inglés” High Performance Liquid Chromatography

HRMS= Espectrometría de Masa de Alta Resolución “del inglés” High Resolution Mass Spectrometry

IPM= Integrated Pest Management

ITS= Internal Transcribed Spacer

LC= Cromatografía Líquida “del inglés” Liquid Chromatography

LMRs= Límites Máximos de Residuos

LOD= Límite de Detección “del inglés” Limit of Detection

LOQ= Límite de Cuantificación “del inglés” Limit of Quantification

ME= Matrix Effect

MEA= Malt Extract Agar

MM= Minimal Medium

MRM= Multiple Reaction Monitoring

MS= Espectrometría de Masas “del inglés” Mass Spectrometry

NCBI= National Center for Biotechnology Information

OSM= Osmotic Stress Medium

PK= Poliquétidos

PNR= Péptidos no Ribosomales

ppb= partes por mil millones “del inglés” parts per billion

qPCR= quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

QuEChERS= Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe

rRNA= ribosomal Ribonucleic Acid

SDA CAF= Sabouroud Dextrose Agar with Chloramphenicol

SPE= Extracción en Fase Sólida “del inglés” Solid Phase Extraction

UHPLC= Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento “del inglés” Ultra High Performance Liquid Chromatography

UV= Radiación Ultravioleta

UV-B= Radiación Ultravioleta-B

ÍNDICE

CAPÍTULO I: Introducción	1
1. Control microbiano de plagas para la seguridad e inocuidad alimentaria	3
2. Los Hongos Entomopatógenos.....	5
2.1. Diversidad y ecología	5
2.2. Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos	8
2.3. Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos	9
2.3.1. Los micoinsecticidas en el control de plagas	10
2.3.2. Evaluación del riesgo y registro de micoinsecticidas	12
3. Metabolitos secundarios secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos 15	
3.1. Detección de metabolitos secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos	19
3.1.1. Detección de metabolitos secundarios en medios líquidos	21
3.1.2. En plantas	22
3.1.3. En artrópodos	23
3.2. Flujo de metabolitos en cadenas tróficas	24
4.-Objetivos.....	26
5. Referencias.....	28
CAPÍTULO II	37
Production of destruxins by <i>Metarhizium</i> strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS	39
Abstract	39
CAPÍTULO III	41
Destruxin A production by <i>Metarhizium brunneum</i> strains during transient endophytic colonisation of <i>Solanum tuberosum</i>	43
Abstract	43
CAPÍTULO IV	45
Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of <i>Galleria mellonella</i> larvae by <i>Metarhizium brunneum</i>	47
Abstract	47
CAPÍTULO V	49
Treatments with <i>Metarhizium brunneum</i> BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator <i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera; Chrysopidae)	51
Abstract	51

CAPÍTULO VI: Discusión General.....	53
Referencias.....	60
CAPÍTULO VII: Conclusiones	63
CAPÍTULO VIII: Anexos.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: Introducción

- Tabla 1.** Clasificación de las divisiones más importantes de hongos entomopatógenos. Elaboración propia a partir de Hibbett et al. (2007), Humber (2012), y Gryganskyi et al. (2012) 6
- Tabla 2.** Metabolitos secundarios producidos por ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs) (basado en Vey et al., 2001; Uchida et al., 2005; Khachatourians y Qazi, 2008; Molnár et al., 2010; Hu et al., 2016)..... 15
- Tabla 3.** Clasificación de las destruxinas según el grupo ácido hidróxido y los aminoácidos que los constituyen (basado en Arroyo-Manzanares et al., 2017) 18

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Introducción

- Figura 1.** Patogénesis de los ascomicetos mitosporicos entomopatogénos: 1) adhesión, 2) germinación, 3) penetración, 4) hifas que atraviesan la cutícula, 5) cuerpos hifales en el hemocele, 6) reacción defensiva celular del insecto. C: Cutícula, EPD: Epidermis, Mb: Membrana basal. Dentro del círculo rojo se recrea el proceso de patogénesis en el insecto, en la parte exterior del círculo pueden observarse los cambios morfológicos externos producidos en el insecto durante la patogénesis..... 9
- Figura 2.** Factores que influyen en el desarrollo y comercialización de un micoinsecticida. 12
- Figura 3.** Fórmula estructural de: A) Bassianina, B) Oosporeina y C) Tenellina. 16
- Figura 4.** Fórmula estructural de: A) Beauvericina, B) Destruxina A, C) Destruxinas B y D) Destruxina E..... 17

CAPÍTULO I: Introducción

1. Control microbiano de plagas para la seguridad e inocuidad alimentaria

Los insecticidas químicos son una parte consustancial de los actuales sistemas de producción agrícola, aunque existe una tendencia marcada, en especial en los países desarrollados (UE, EEUU y Canadá), a la progresiva restricción de su empleo, con el objetivo de proteger a los consumidores mediante exigencias toxicológicas más exhaustivas de cara al registro, y con límites máximos de residuos (LMRs) cada vez inferiores. Además, se promulga la sustitución de estos compuestos químicos por nuevas alternativas más respetuosas con el medio y más inocuas para los consumidores. Esta tendencia es sin duda impulsada por la creciente preocupación de los consumidores por la salud y la percepción de que la presencia de residuos de insecticidas en el medio ambiente es perjudicial para la calidad de vida.

El último eurobarómetro revela que la contaminación por residuos de productos fitosanitarios es la principal preocupación asociada al consumo de alimentos por parte de los ciudadanos europeos, con un 72 % de ellos muy preocupados por la misma (EFSA, 2013). Los consumidores depositan su confianza en las agencias nacionales y europea de seguridad e inocuidad alimentaria en la gestión de posibles riesgos vinculados a los alimentos, y además, toda la legislación europea ha virado en el siglo XXI hacia el uso sostenible de plaguicidas, para minimizar estos riesgos que preocupan a los consumidores (Kabaluk et al., 2005). En definitiva, se ha producido un cambio de paradigma en control de plagas, incluso plasmado en la actualización de los evaluadores de riesgo de los insecticidas (Köhler y Triebkorn, 2013).

No en vano, el programa de revisión de sustancias activas en la UE finalizado en 2010, supuso una exhaustiva criba de materias activas con la aprobación de sólo un 33.8 % (378) de las 1119 sustancias consideradas. Desde junio de 2011, el Reglamento de la UE 1107/2009 de comercialización de productos fitosanitarios regula el registro de los productos fitosanitarios, y tiene por objeto último garantizar la salud humana, animal y del medio ambiente. Por otro lado, la Directiva de Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios (2009/128/CE), establece que, a partir del 1 de enero de 2014, bajo el Real Decreto 1311/2012, la Gestión Integrada de Plagas (GIP) es requisito indispensable en todos los tratamientos fitosanitarios llevados a cabo en las explotaciones agrícolas. El

Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, contempla la realización de un Plan de Acción Nacional para introducir criterios de sostenibilidad en el uso de productos fitosanitarios, y establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de dichos productos. Este tiene como objetivos reducir los riesgos de utilización de los productos fitosanitarios sobre la salud humana y el medio ambiente, así como fomentar el empleo de la GIP y de métodos de control alternativos.

A este respecto, el último informe anual sobre residuos de plaguicidas en alimentos publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2017), realizado a partir de 84341 muestras de alimentos para buscar 774 productos fitosanitarios diferentes, indica que la amplia mayoría de alimentos consumidos en la Unión Europea son seguros en relación con los residuos de productos fitosanitarios, con un 97.2 % ajustados a los LMRs fijados por la legislación alimentaria europea y un 53.2 % de las muestras con ausencia de residuos en límites cuantificables. Aun así, el 43.9 % de las muestras contenía residuos que no excedían los límites legales, mientras que el 5.6 % de las muestras de países no pertenecientes a la UE, y en el 1.7 % de las muestras para los productos de los países de la UE y del Espacio Económico Europeo superaron los límites legales, un aumento del 1.6 % respecto a 2014 (EFSA, 2017).

Por tanto, uno de los grandes retos de la agricultura en la actualidad es continuar con la producción de alimentos para atender las necesidades de una población que alcanzará los 9200 millones de habitantes en 2050, es decir, garantizar la seguridad e inocuidad alimentaria (Godfray et al., 2010; FAO, 2016), con un impacto mínimo sobre el medioambiente (Gill y Garg, 2014). En este contexto, en Europa se promulga normativamente el empleo de métodos de control de plagas alternativos a los químicos, como son los microorganismos entomopatógenos, que se han convertido en una opción clave dentro de la gestión integrada de plagas (GIP) (Schrank y Vainstein, 2010).

El control microbiano de plagas, mediante virus, bacterias, nematodos y hongos, cumple los requisitos de seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reduce la presencia de residuos de insecticidas en los alimentos y preserva la biodiversidad (Copping y Menn, 2000; Quesada-Moraga et al., 2009). Los hongos entomopatógenos (HE), y en especial los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs), muestran un

gran potencial para el desarrollo de bioinsecticidas debido a su presencia natural, competencia ambiental, gran capacidad de biocontrol, y bajo impacto sobre el medio ambiente y la fauna útil (Thomas y Read, 2007). El control biológico con HE podría contribuir a la producción sostenible de cultivos, ya sea como una estrategia independiente o para apoyar otras estrategias dentro de la GIP (Pell et al., 2010).

2. Los Hongos Entomopatógenos

Los HE son un conjunto diverso de especies con capacidad para infectar y causar enfermedades en artrópodos, de los que obtienen la energía necesaria para desarrollarse, como biotrofos y necrotrofos, en un proceso de continua coevolución, causando hasta el 80 % de las enfermedades que padecen las poblaciones de insectos en la mayoría de los ecosistemas terrestres, con énfasis en los ecosistemas agroforestales (Badii y Abreu, 2006; Roy et al., 2006; Vega et al., 2009; Lacey et al., 2015). Además de proporcionar múltiples servicios ecosistémicos (Meyling y Eilenberg, 2007; Meyling et al., 2009; Pell et al., 2010), los HE se han desarrollado como una importante estrategia dentro del control integrado de plagas, al presentar mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007; Faria y Wraight, 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

2.1. Diversidad y ecología

Los HE son un grupo filogenéticamente diverso, que presentan reproducción sexual y asexual, con especies incluidas principalmente en las divisiones Entomophthoromycota y Ascomycota (Tabla 1), si bien hay algunos representantes en Blastocladiomycota y Basidiomycota (Hibbett et al., 2007; Gryganskyi et al., 2012; 2013; Humber, 2012; Wang et al., 2016). Hasta el momento se han descrito más de 750 especies en ambas divisiones, y la atención se ha centrado en especies de ascomicetos del orden Hypocreales, con una gama de hospedantes relativamente amplia y susceptibles de producción en masa (Butt et al., 2016). Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin 1883, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912, *Isaria fumosorosea* Wize 1904 y *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch 1926 (Lacey et al., 2017).

Tabla 1. Clasificación de las divisiones más importantes de hongos entomopatógenos. Elaboración propia a partir de Hibbett et al. (2007), Humber (2012), y Gryganskyi et al. (2012)

División	Clase	Orden	Familia	Género		
Entomophthoromycota	Entomophthoromycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Batkoa</i> , <i>Entomophaga</i> , <i>Entomophthora</i> , <i>Erynia</i> , <i>Eryniopsis</i> , <i>Furia</i> , <i>Massospora</i> , <i>Orthomyces</i> , <i>Pandora</i> , <i>Strongwellsea</i> , <i>Zoophthora</i> ,		
			Ancylistaceae	<i>Ancylistes</i> , <i>Conidiobulus</i> , <i>Macrobiotophthora</i>		
			Completoriaceae	<i>Complectoria</i>		
			Meristacraceae	<i>Meristacrum</i> , <i>Tabanomyces</i>		
			Basidiobolomyces	Basidiobolus	<i>Basidiobolus</i>	
Ascomycota	Sordariomycetes	Neozygiales	Neozygitaceae	<i>Apterivorax</i> , <i>Neozygites</i> , <i>Thaxterosporium</i>		
			Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Paecilomyces</i>
			Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Archersonia</i> , <i>Hypocrella</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Normurea</i> , <i>Pochonia</i> , <i>Regiocrella</i> , <i>Tipo-Paecilomyces</i> , <i>Tipo-Verticillium</i>
					Cordycipitaceae	<i>Beauveria</i> , <i>Cordyceps</i> , <i>Engyodontium</i> , <i>Isaria</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Simplicillium</i> , <i>Microhilum</i> , <i>Tipo-Mariannaea</i> , <i>Torrubiella</i>
					Ophicordycipitaceae	<i>Culicinomyces</i> , <i>Elaphocordyceps</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Hymenostibe</i> , <i>Metharhiziopsis</i> , <i>Ophiocordyceps</i> , <i>Paraisaria</i> , <i>Sorospora</i> , <i>Syngliocadium</i> , <i>Tipo-Paecilomyces</i> , <i>Tipo-Verticillium</i> , <i>Tolypocladium</i>

No se incluyen por su carácter minoritario los representantes entomopatógenos de las divisiones Blastocladiomycota y Basidiomycota.

A pesar de la creencia generalizada de que los dos reservorios de AMEs más importantes son el suelo, considerado el principal hasta la fecha, así como las poblaciones de artrópodos hospedantes a las que infectan, varias investigaciones realizadas en el siglo XXI ponen de manifiesto la existencia de sorprendentes asociaciones de los AMEs con las plantas, en el filoplano, como endófitos, o incluso como microorganismos competentes en la rizosfera (Quesada-Moraga et al., 2014; Garrido-Jurado et al., 2015), de las que se derivan nuevas aplicaciones en Agricultura (Quesada-Moraga, 2013), tanto en la respuesta de la planta a otros estreses de tipo biótico, con énfasis en los microorganismos fitopatógenos (Ownley et al., 2008; 2010), como los de tipo abiótico, con promoción del crecimiento y mejora de la nutrición mineral (Lacey et al., 2015; Sánchez-Rodríguez et al., 2015; 2016). No obstante, un mayor conocimiento de su ecología y de sus funciones en la naturaleza se considera un prerrequisito para la evaluación de sus contribuciones al control de plagas y para predecir el impacto de las prácticas agrícolas en sus poblaciones (Meyling y Eilenberg, 2007; Fisher et al., 2011).

Los propágulos infectivos de los HE pueden persistir fuera del insecto hospedante tanto en el suelo como en asociaciones con las plantas (filoplano o endófitos), e incluso en el aire (Aira et al., 2007; Hesketh et al., 2010; Scheepmaker y Butt, 2010; Quesada-Moraga et al., 2014; Lacey et al., 2015). Por ello, están expuestos a un gran número de procesos interactivos tanto abióticos como bióticos en los ecosistemas naturales y agroforestales, que son extremadamente difíciles de cuantificar de manera individual sobre la dinámica de los HE, y juegan un papel importante en la infección y esporulación de los mismos (Quesada-Moraga et al., 2007; Jaronksi, 2010; Lacey et al., 2015).

Dentro de los factores abióticos, la **humedad relativa** es esencial en la actividad fúngica, por influir sobre la germinación, infección y esporulación, si bien, las dos primeras etapas se desarrollan en función de condiciones del microambiente que rodea los conidios que suele superar el 90 % de humedad (Inglis et al., 2001; Vega et al., 2009). La **radiación solar** es perjudicial para la persistencia de los conidios, especialmente en el filoplano, donde estos pueden desactivarse rápidamente (Jaronksi, 2010). De ella, la radiación ultravioleta (UV-B) es la banda del espectro solar más perjudicial y mutagénica

para los procesos biológicos afectando la persistencia de los propágulos (Smits et al., 1996; Garrido-Jurado et al., 2011a). Por último, la mayoría de los HE requieren un rango de **temperatura** óptimo entre 20 y 30 °C para el adecuado inicio y progreso del proceso patogénico (Quesada-Moraga et al., 2007; Hesketh et al., 2010).

Entre los factores bióticos, la **fungistasis** puede afectar a la viabilidad y persistencia de los HE, que a su vez depende de otros factores relacionados con los estímulos procedentes del hospedante y del suelo que son necesarios para su germinación y dispersión (Hesketh et al., 2010; Jaronski, 2010). Algunos **invertebrados geobiontes o geófilos**, en especial colémbolos, ácaros o lombrices, desempeñan un papel importante en la dispersión de los conidios a nuevos hospedantes, (Hesketh et al., 2010). Además, la prevalencia de los HE en el suelo, está estrechamente relacionada con la presencia de insectos susceptibles a la infección (Meyling y Eilenberg, 2007; Lacey et al., 2015). Cuando los HE se encuentran en el filoplano, pueden verse afectados por la **química de la superficie de las plantas y la emisión de volátiles**, mientras que en la rizosfera la liberación de **exudados radicales** influye sobre el microbiota del suelo, y puede proporcionar un entorno favorable para estas especies fúngicas (Bruck, 2010; Cory y Ericsson, 2010).

2.2. Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Los HE, en especial los AMEs, infectan a los insectos hospedantes por la vía tegumentaria (Figura 1), con una serie de factores intrínsecos y extrínsecos que determinan en última instancia la patogeneidad de la cepa fúngica. El primer paso es la germinación y penetración que comienza con la hidratación de los conidios y la activación y la producción de enzimas hidrolíticas. Si encuentra condiciones nutricionales y ambientales favorables germinan y forman estructuras específicas de penetración por medio de las cuales el hongo alcanza el hemocele, gracias a la acción conjunta de la presión mecánica y la producción de enzimas que degradan la cutícula. La capacidad de los conidios para germinar requiere la presencia de una fuente de carbono, el anclaje sobre un sustrato, y la producción y utilización de precursores de crecimiento celular del insecto. Una vez dentro del hemocele, la colonización del hospedante se lleva a cabo por medio de cuerpos hifales, para lo que deben vencer las respuestas defensivas y

humoral del insecto. El hongo invade el interior del insecto y le ocasiona la muerte por invadir los tejidos y consumir todos los nutrientes, por la producción de compuestos insecticidas e incluso por asfixia cuando hay crecimiento en el sistema respiratorio. Después de la muerte, el hongo inicia su etapa de crecimiento necrotrofo, y en condiciones de humedad y temperatura favorables, las hifas emergen del cadáver, se produce la esporulación y dispersión de conidios en el medio, que contribuye a la autodiseminación (Goettel et al., 2005; Charnley y Collins, 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

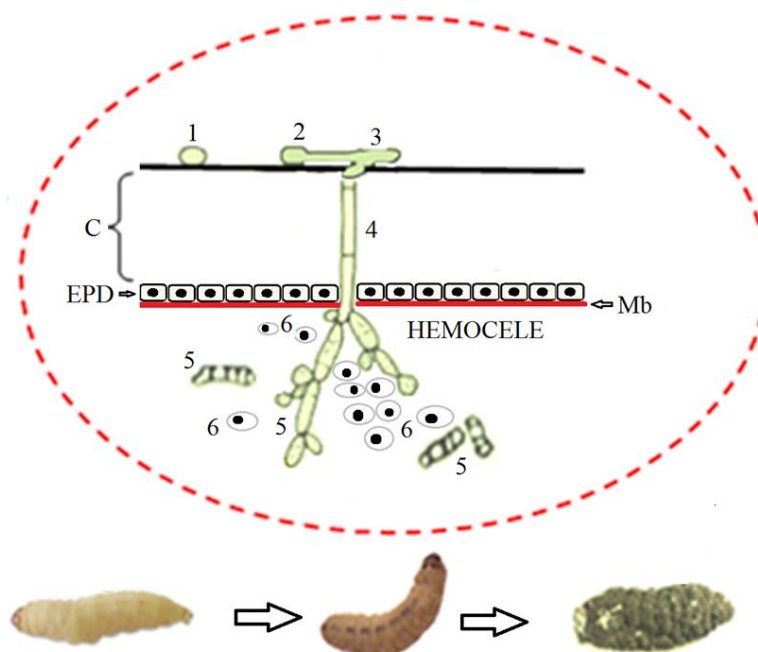


Figura 1. Patogénesis de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos: 1) adhesión, 2) germinación, 3) penetración, 4) hifas que atraviesan la cutícula, 5) cuerpos hifales en el hemocele, 6) reacción defensiva celular del insecto. C: Cutícula, EPD: Epidermis, Mb: Membrana basal. Dentro del círculo rojo se recrea el proceso de patogénesis en el insecto, en la parte exterior del círculo pueden observarse los cambios morfológicos externos producidos en el insecto durante la patogénesis.

2.3. Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Las estrategias para utilizar los AMEs en el control de plagas de insectos son cuatro (Eilenberg et al., 2001). (1) **Conservación**, que implica la modificación de algunas prácticas agronómicas para proveer el hábitat adecuado al HE y los recursos que favorezcan su actividad. (2) **Control biológico clásico** con la introducción intencionada del HE para su establecimiento y control de la plaga a largo plazo. (3) **Inoculación** mediante aplicaciones puntuales del hongo con el objetivo de que se multiplique y

controle la plaga durante un periodo de tiempo determinado, pero no permanente. (4) **Inundación** mediante aplicaciones puntuales del hongo para disminuir la población del insecto en un plazo de tiempo corto, en particular, los AMEs están bien adaptados a esta estrategia, así como para su desarrollo como micoinsecticidas.

2.3.1. Los micoinsecticidas en el control de plagas

Los micoinsecticidas son insecticidas cuya materia activa está constituida por propágulos de AMEs destinados a controlar las plagas de insectos y ácaros, principalmente mediante inundación (Faria y Wraight, 2007; Lacey et al., 2017). Por su naturaleza, la mayoría son selectivos, no dejan residuos y tienen poco impacto sobre la artrópodo fauna auxiliar, por lo que se adaptan con precisión a los criterios de la agricultura sostenible (Hajek, 2004; Chandler et al., 2011). Desde la década de 1960 se han desarrollado un gran número de micoinsecticidas en todo el mundo, y en la actualidad hay disponibles en el mercado mundial alrededor de 30 productos, que incluyen como materias activas hasta 13 especies fúngicas, en su mayor parte pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Lecanicillium* (Faria y Wraight, 2007; Chandler et al., 2011; Lacey et al., 2015; 2017; Siegwart et al., 2015). A pesar del número de productos comercializados, los micoinsecticidas no han alcanzado la cuota de mercado que sería de esperar, especialmente en los EE.UU. y la UE, posiblemente debido a que, comparados con los insecticidas químicos, su eficacia es más inconsistente, y sus tiempos letales más largos, a pesar de su seguridad frente a la salud humana, animal y al medio ambiente (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Jaronski, 2010).

La selección de una cepa adecuada para el desarrollo de un micoinsecticida es un proceso complejo y clave para garantizar su eficacia y éxito comercial. Además de mostrar actividad insecticida, la cepa debe producir propágulos infectivos estables (conidios aéreos, microesclerocios, conidios sumergidos y/o blastosporas) que puedan ser producidos en masa, con tecnología adecuada y de forma económicamente viable (Bartlett y Jaronski, 1988; Faria y Wraight, 2007). Por otro lado, las estrategias de producción y formulación de estos potenciales micoinsecticidas deben considerar requisitos y limitaciones ambientales y ecológicos (Vega et al., 2009; Pell et al., 2010).

Por ejemplo, la temperatura y la humedad son factores críticos en el crecimiento del hongo y en su patogeneicidad (Inglis et al., 1996; Faria y Wraight, 2001; Yeo et al., 2003). Durante el proceso inicial de la infección (germinación y penetración de la cutícula), el hongo es muy susceptible a factores ambientales, tales como la temperatura, humedad, radiación UV, actividad microbiana en el filoplano o rizosfera y fisiología del hospedante que afectan la eficacia y la persistencia de tratamientos fúngicos aplicados contra plagas foliares o de suelo (Figura 2) (Jaronski, 2010; Jackson et al., 2010). La formulación de un micoinsecticida puede estabilizar y aumentar la eficacia de los propágulos infectivos incidiendo positivamente sobre su tolerancia a la desecación, temperatura y UV-B, así como la velocidad de germinación e infección (Jackson y Schisler, 1992; Jackson, 1997; Vega et al., 1999). Finalmente, el producto formulado debe proporcionar un coste-beneficio para el usuario final, permanecer viable e infectivo durante el almacenamiento y proporcionar un control consistente de insectos en condiciones de campo, lo que convierte a la formulación en un proceso clave en el desarrollo de un micoinsecticida (Jackson et al., 2010).

Los micoinsecticidas comercializados se emplean fundamentalmente bajo la estrategia de inundación, utilizando maquinaria convencional para aplicar sobre el sustrato vegetal o el suelo altas concentraciones de propágulos infectivos (Eilenberg et al., 2001). La mayoría de los productos están formulados a base de conidios, en sistemas sólidos o bifásicos, pero también estos conidios, al igual que las blastosporas, pueden formularse en medios líquidos (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Generalmente, en los géneros *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. e *Isaria* spp. se emplean dispersiones oleosas, ya que sus conidios aéreos son altamente hidrofóbicos debido a las glicoproteínas que se encuentran en la superficie de la pared celular (Jackson et al., 2010). Finalmente, para el desarrollo comercial de un micoinsecticida sólo deben considerarse aquellas cepas altamente virulentas frente al insecto hospedante, fáciles de producir en masa, cuyos estudios de seguridad, ecología, fisiología y genética hayan resultado favorables para la salud humana, animal y el medio ambiente (Quesada-Moraga et al., 2009; Hussain et al., 2014). Las deficiencias en cualquiera de estas cualidades pueden impedir que el agente se registre y se convierta en un producto comercial.

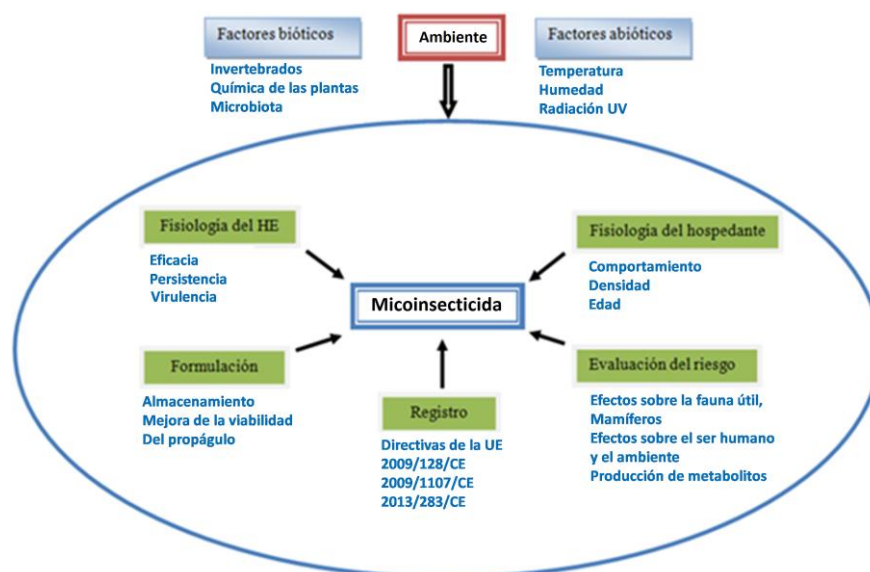


Figura 2. Factores que influyen en el desarrollo y comercialización de un micoinsecticida.

2.3.2. Evaluación del riesgo y registro de micoinsecticidas

La evaluación de los riesgos derivados del empleo de micoinsecticidas sobre la salud humana, animal y el medio ambiente es una de las mayores barreras en el registro y posterior comercialización de HE para el control de plagas (Scheepmaker y Butt, 2010). El “riesgo” se define como *la probabilidad de que ocurra un peligro*. Basada en esta definición, la UE impone el requerimiento de identificar todos los potenciales peligros antes de evaluar el riesgo, es decir, antes de evaluar la probabilidad de que ocurra este peligro (Alabouvette y Cordier, 2011). Este principio de precaución, que es la base de la evaluación de riesgos de insecticidas químicos en la UE, es el que también se aplica a los agentes de control biológico. Por ello, a menudo se menciona que estos agentes podrían presentar riesgos similares a los insecticidas químicos, incluso riesgos que aún no han sido identificados en ellos (Ehlers, 2011).

Los requerimientos para la evaluación de riesgos (Alabouvette y Cordier, 2011), que recoge el Reglamento de la UE 1107/2009 de comercialización de productos fitosanitarios son: i) **Identificación y caracterización del microorganismo**, información clave y primer paso para garantizar la seguridad. ii) **Propiedades biológicas del microorganismo**, se requiere un informe sobre el conocimiento disponible en la literatura, como el origen, hábitat, ciclo biológico, relaciones con patógenos conocidos o cepas beneficiosas y modo de acción. iii) **Información adicional del microorganismo**, como puede ser una descripción de los métodos de producción de la sustancia activa. iv)

Métodos analíticos, se precisa descripción de los métodos utilizados para identificar los microorganismos y los contaminantes, detectar y cuantificar metabolitos secundarios y residuos. v) **Efectos en la salud humana**, con énfasis en la posible secreción de metabolitos específicos que pueden ser nocivos. vi) **Destino y comportamiento en el ambiente**, con atención al flujo en las cadenas tróficas de los mencionados metabolitos. vii) **Efectos sobre organismos no diana**, donde resulta muy importante su compatibilidad con la fauna útil (Alabouvette y Cordier, 2011).

En la actualidad existe un debate importante en el seno de la UE sobre los requisitos que deben poseer los datos del registro de micoinsecticidas, que no abordan adecuadamente la naturaleza específica de estos productos, los ensayos de evaluación de los riesgos derivados de su empleo, los procedimientos administrativos y los costes (Ravensberg, 2011). El problema subyacente es que los datos de registro de un micoinsecticida corresponden a una modificación sucinta de los requeridos para los insecticidas químicos convencionales, lo que es utilizado por el regulador para hacer una evaluación de los riesgos asociados al modo de acción, así como las evaluaciones toxicológicas y eco-toxicológicas, todo ello convertido en un hándicap de cara al registro de este tipo de productos (Chandler et al., 2011). Por otro lado, el largo periodo necesario para culminar el registro (más de 10 años) desalienta a las empresas a invertir en el desarrollo de nuevos productos microbianos (Strauch et al., 2011).

Esta dificultad de registro contrasta con las normativas recientes de la UE que promueven el uso sostenible de plaguicidas y gestión integrada de plagas, dando prioridad a las alternativas no químicas, con énfasis en el empleo de agentes de control biológico, por lo que se hace necesaria y urgente la armonización y adaptación de la normativa de registro de insecticidas microbianos a las particularidades de estos agentes vivos de control biológico, para asegurar una mayor efectividad y viabilidad económica, sin comprometer la seguridad para la salud humana, animal y del medio ambiente (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Ehlers, 2011). Para ello, hay determinadas acciones y proyectos de apoyo a la política de la UE, que se han desarrollado para revisar los posibles riesgos en el uso de estos agentes de biocontrol. Tal es el caso de **REBECA** (*Regulation of Biological Control Agents*), donde se comparó la legislación al respecto en la UE y EEUU, y se diseñaron procedimientos de regulación alternativos, menos

burocráticos y más eficientes para acelerar el acceso de estos productos al mercado con menores costes de registro (Ehlers et al, 2008). Por otro lado, en los proyectos **RAFBCA** (*Risk assessment of fungal biological control agents*) del V Programa Marco y **BIPESCO** (*Biocontrol of Important Soil Dwelling Pests by Improving the Efficacy of Insect Pathogenic Fungi*) del VI Programa Marco, se evaluó el riesgo ecotoxicológico presentado por los metabolitos secretados por AMEs para la salud humana, animal y medioambiental, mediante el desarrollo de técnicas y métodos para su detección y estudios moleculares y bioquímicos sobre su modo de acción (Strasser y Pernfuss, 2005; Strasser et al., 2011).

Más recientemente, **INBIOSOIL, Proyecto del VII Programa Marco de la UE *Innovative biological products for soil pest control* (282767. FP7-ENV-2011-3.1.9.-1 ECO-INNOVATION-TwoStage/CP)** (<http://inbiosoil.uni-goettingen.de>), cuyo consorcio ha estado integrado por trece instituciones europeas, entre ellas la Universidad de Córdoba, tenía entre sus objetivos principales la validación de los métodos propuestos por el proyecto RAFBCA para el análisis de la producción de los metabolitos secundarios clave en varias cepas de AMEs en etapas avanzadas de desarrollo comercial, en especial del género *Metarhizium*, para el control de varias plagas de insectos de suelo, objetivo al que ha contribuido el Grupo de Investigación PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” de la Universidad de Córdoba.

A pesar de que los AMEs se consideran seguros para la salud humana y el medio ambiente, la producción y evaluación de los datos de seguridad, requeridos por las instituciones para el registro de nuevas cepas, es un proceso largo y costoso (Zimmermann, 2007; Strauch et al., 2011). El principal problema en la generación de datos de seguridad para el registro y la comercialización se debe a la producción de metabolitos secundarios por algunas de las cepas, que aumentan los costes de producción (Strasser et al., 2011). **Por lo tanto, es necesario el desarrollo de metodologías para la detección de metabolitos secundarios durante el proceso de registro, si bien las autoridades reguladoras exigen información detallada sobre la producción de metabolitos secundarios, que constate su inocuidad para la salud humana y animal** (Skrobek et al., 2008; Strasser et al., 2011; Sundh y Goettel, 2013; Garrido-Jurado et al., 2016).

3. Metabolitos secundarios secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Los AMEs secretan diversos metabolitos secundarios (Tabla 2), pequeñas moléculas de bajo peso molecular (menos de 5000 Da) que muestran una amplia gama de actividades biológicas y diversas aplicaciones tanto en el control de plagas como en la industria farmacéutica (Charnley, 2003; Molnár et al., 2010; Sbaraini et al., 2016). Estos metabolitos están asociados a distintas fases del ciclo de vida del microorganismo y son producidos bajo condiciones específicas de temperatura, pH y nutrición (Kandhai et al., 2011; Bryden, 2012; Lozano-Tovar et al., 2017). No obstante, estos metabolitos secundarios pueden ser producidos bajo diferentes condiciones ambientales en diferentes cantidades que varían entre especies y cepas fúngicas (Skrobek et al., 2006; Strauch et al., 2011). Además, los metabolitos secundarios pueden estar asociados a cambios en el desarrollo del insecto hospedante, en su comportamiento, en el inicio de la mortalidad asociada a la infección fúngica, en su reproducción, e incluso se han descrito algunas funciones como semioquímicos y mitigadores de estreses bióticos y abióticos (Krasnoff et al., 2007; Pal et al., 2007, Xu et al., 2009; Råberg et al., 2009; Molnár et al., 2010; Rohlf y Churchill, 2011).

Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos por ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AMEs) (basado en Vey et al., 2001; Uchida et al., 2005; Khachatourians y Qazi, 2008; Molnár et al., 2010; Hu et al., 2016)

AMEs	Familia/Metabolitos
<i>Aschersonia</i> spp.	Destruixinas
<i>Beauveria</i> spp.	Ácido oxálico, bassianina, bassiatina, basianólidos, bassiacridina, beauvericina, beauverólidos, ciclosporinas, oosporeina, tenellina
<i>Cordyceps</i> spp.	*Annulatins, cicapeptinas, cordicepina, cordyheptadipéptidos, *cryptosporioptide A, opaliferina, *pinophilin C, *terreusinone A
<i>Culicinomyces</i> spp.	Culicininas
<i>Syngliocladium</i> spp.	Gliovirina, glisosporinas, viridinas
<i>Hirsutella</i> spp.	Hirsutellidos, hirsutelina A, hirsutidos
<i>Isaria</i> spp.	Cicapeptinas, fumorisinas, isarinas, isaridinas, isarolides, tenuipirona
<i>Metarhizium</i> spp.	Ácido helvólico, aurovertinas, citocalasinas, destruxinas, hydroxifungerinas, serinocuclinas, swainsonina, tyrosina betaina
<i>Ophiocordiceps</i> spp.	*Cordycommunin
<i>Paecilomyces</i> spp.	Beauvericina, beauverólidos, conoideocrellide, farinosinas, militarinones, leucinostinas, paecilodepsipéptidos, paecilomicina
<i>Tolypocladium</i> spp.	Ciclosporinas, efrageptinas, tolipocina
<i>Torrubiella</i> spp.	*Torrubiellones
<i>Verticillium</i> spp.	Basianólidos, ciclosporinas, verticilidos,

*Se utiliza nombre en inglés porque no se ha encontrado su equivalente en español.

Los poliquétidos (PK) y péptidos no ribosomales (PNR) son las principales clases de metabolitos secundarios secretados por AMEs, cuya expresión y secreción parecen ser controladas por diversos mecanismos reguladores genéticos y celulares (Rohlf s y Churchill, 2011; Hu et al., 2016). Son sintetizados en mayor parte en grandes complejos multienzimáticos citoplasmáticos y no en ribosomas (Vey, 1998). Los PNR están compuestos principalmente de aminoácidos e hidroxiaácidos modificados, y son sintetizados por las enzimas llamadas péptido sintetasa no ribosomales. El gen de PNR sintetasa codifica una cadena péptidica compuesta de varios módulos, que activan aminoácidos y se combinan con un producto péptido específico (Hu et al., 2016).

Los metabolitos secundarios de muchos AMEs son PK, biosintetizados por sintasas de poliquétidos a partir de pequeños monómeros de ácido carboxílico, la diversidad estructural se introduce modificando el número y el tipo de los precursores de los monómeros (Molnár et al., 2010; Hu et al., 2016). En el grupo de metabolitos PK se incluyen el pigmento rojo **oosporeina**, el pigmento amarillo **tenellina** y la **bassianina** (Figura 3). La oosporeina fue descrita en 1944, es producida por el género *Beauveria* spp., y muestra actividades antifúngica, antibiótica y antiviral (Seger et al., 2005; Love et al., 2009). Al igual que la tenellina y bassianina, la oosporeina inhibe la actividad de la ATPasa de la membrana de los eritrocitos a través de reacciones redox de grupos sulfhidrilo y promueve la lisis celular causando alteraciones en ellos (Vey et al., 2001). Estos dos últimos metabolitos tienen un mecanismo de síntesis similar, aunque la tenellina tiene también una vía alternativa para su biosíntesis en la que implica a la tirosina (Khachatourians y Qazi, 2008).

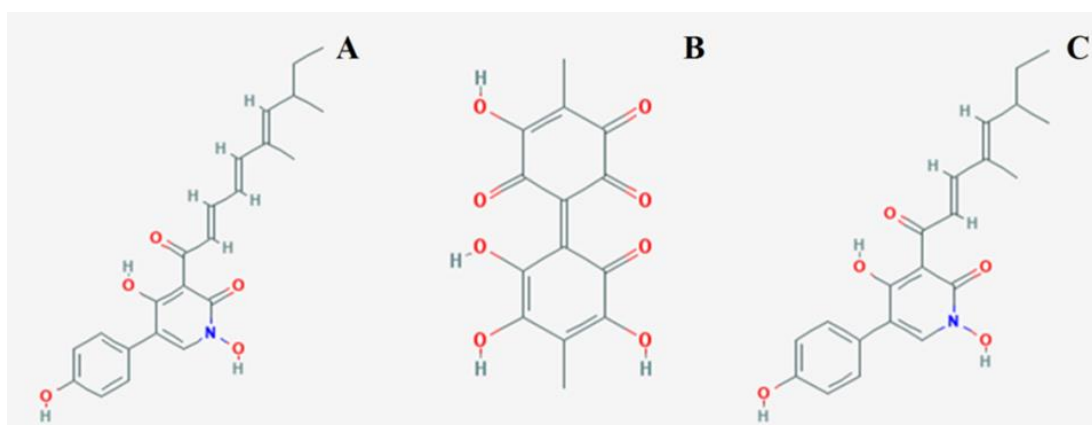


Figura 3. Fórmula estructural de: A) Bassianina, B) Oosporeina y C) Tenellina.

Se han aislado e identificado varios tipos de PNR de diferentes géneros de AMEs, entre los que destacan la **beauvericina** y las **destruxinas** por sus cualidades insecticidas (Figura 4). La beauvericina, un tipo de hexadepsipéptido cíclico (Figura 4) que consta de tres D α -hidroxi-isovaléricos y tres residuos de N- metilfenilalanina en una secuencia alterna, es producida principalmente por AMEs de los géneros *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. (Wang y Xu, 2012). Los tres aminoácidos aromáticos están unidos por enlaces peptídicos que forman enlaces alternativos a lactonas de ésteres cíclicos intramoleculares para formar una estructura depsipeptídica (Geddes y Akrigg, 1976). Este metabolito presenta actividad insecticida, antibiótica, antitumoral y citotóxica sobre células humanas (Vey et al., 2001; Santini et al., 2009).

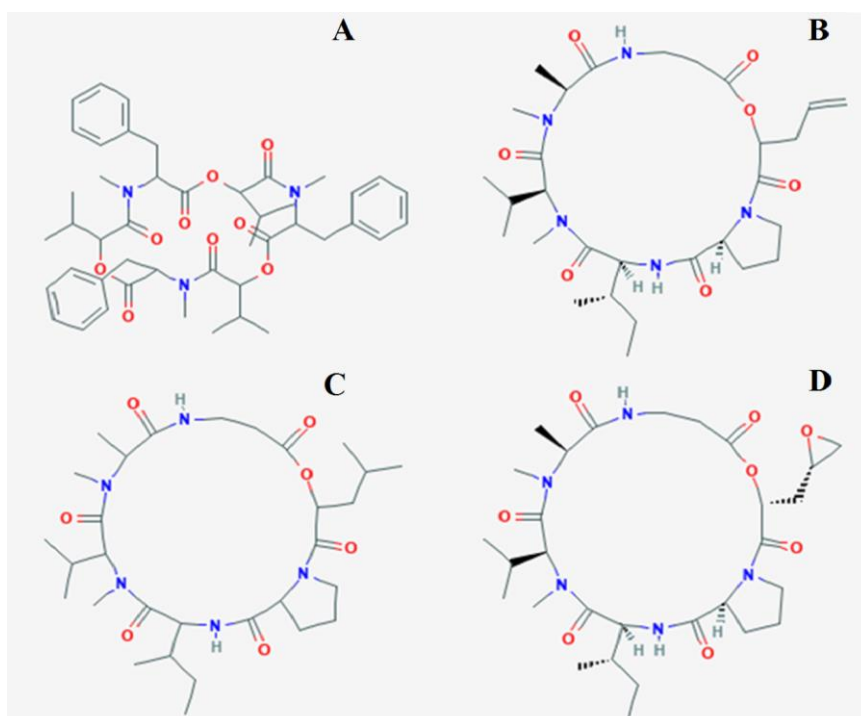


Figura 4. Fórmula estructural de: A) Beauvericina, B) Destruxina A, C) Destruxinas B y D) Destruxina E.

Entre los metabolitos secundarios producidos por los AMEs, **las destruxinas**, que constituyen una familia de 44 derivados, **son los principales secretados por el género *Metarhizium* spp.**, por lo que han recibido especial atención (Arroyo-Manzanares et al., 2017). Las destruxinas son hexadepsipéptidos cíclicos compuestos por α -ácido-hidróxido y residuos de cinco aminoácidos (Figura 4), que se describieron por primera vez en 1961 (Kodaira, 1961; Pedras et al., 2002). Se clasifican dependiendo del ácido hidróxido y de los aminoácidos que lo constituyen (Tabla 3) (Arroyo-Manzanares et al., 2017).

Tabla 3. Clasificación de las destruxinas según el grupo ácido hidróxido y los aminoácidos que los constituyen (basado en Arroyo-Manzanares et al., 2017)

Ácido hidróxido	Destruuxina	Aminoácidos
2-Hidroxi-4-pentenoico	A	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	A ₁	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
	A ₂	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
	A ₃	MeAla Ile MeVal MeAla β-Ala
	A ₄	Pro Ile Melle MeAla β-Ala
	A ₅	3-MePro Ile Melle MeAla β-Ala
	Desm A	Pro Ile Val MeAla β-Ala
	Dihydro A	Pro Ile Val Ala β-Ala
	Ros B	3-MePro Ile MeVal MeAla β-Ala
2-Hidroxi-4-metilpentenoico	B	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	B ₁	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
	B ₂	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
	B ₄ = Homo B	Pro Ile Melle MeAla β-Ala
	Desm B	Pro Ile Val MeAla β-Ala
	Desm B ₂	Pro Val Val MeAla β-Ala
	Proto B	Pro Ile Val Ala β-Ala
	Ros A	3-MePro Ile MeVal MeAla β-Ala
	Pseudo A	Pro Phe Melle MeLeu β-Ala
	Pseudo B	Pro Phe MeVal MeLeu β-Ala
	Pseudo C	3-MePro Phe MeVal MeVal β-Ala
	[Phe ₃ , N-MeVal ₅] destruxina B	Pro Phe MeVal MeVal β-Ala
	2,5-Dihidroxi-4-metilpentenoico	C
C ₁		Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
C ₂		Pro Val MeVal MeAla β-Ala
Desm C		Pro Ile Val MeAla β-Ala
2-Hidroxi-4-metilpentano-1,5-dioico	D	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	D ₁	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
	D ₂	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
2-Hidroxi-4,5-epoxipentanoico	Ed	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	Ed ₁	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
	Ed ₂	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	E	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
2,4,5-Trihidroxipentanoico	E ₁	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala
	E ₂	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
2,4-Dihidroxipentanoico	F	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
5-Cloro-2,4-dihidroxipentanoico	Cl (E clorhidrina)	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	E ₂ clorhidrina	Pro Val MeVal MeAla β-Ala
	A ₄ clorhidrina	Pro Ile Melle MeAla β-Ala
	[β-MePro] E ₂ clorhidrina	3-MePro Ile MeVal MeAla β-Ala
4-Cloro-2,5-dihidroxipentanoico	Regioisómero E clorhidrina	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
2-Hidroxi-3-metilpentanoico	Bursa A	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	Bursa B	4-MePro Ile MeVal MeAla β-Ala
2-Hidroxi-4-etilpentano-1,5-ácido dioico	G ₁	Pro Ile MeVal MeAla β-Ala
	G ₂	Pip Ile MeVal MeAla β-Ala

Pro: Prolina, Ile: Isoleucina, MeVal: N-metilvalina, MeAla: N-metilalanina, β-Ala: β-Alanina, Pip: ácido piperico, Val: Valina, Melle: N-metilisoleucina, 3-MePro: 3-metilprolina, F: Fenilalanina, MeLeu: N-metileucina, Ros: Roseotoxina, Bursa: Bursaphelocide.

Las destruxinas A, B, y E son las más predominantes y se consideran factores de virulencia, además de presentar actividad fitotóxica, insecticida, citotóxica y

anticancerígena (Amiri et al., 1999; Kershaw et al., 1999; Molnár et al., 2010). Estos compuestos afectan a las respuestas inmunes tanto celulares como humorales de los insectos (Vilcinskas et al., 1997; Skrobek et al., 2008; Wang et al., 2012).

3.1. Detección de metabolitos secretados por los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Hasta la fecha, los diversos metabolitos secundarios secretados por los AMEs no han demostrado ningún riesgo para la salud humana y el medio ambiente, aunque la información sobre los niveles nocivos de estos metabolitos para la salud humana y medioambiental es insuficiente (Strasser et al., 2011). De hecho, las evaluaciones de riesgo de estos metabolitos secundarios establecen los niveles permitidos en los diferentes agentes de la cadena trófica, pero éstos deben de ser fijados en función de los métodos analíticos disponibles para su detección y cuantificación a nivel incluso de cepa (Alabouvette y Cordier, 2011). Sin embargo, esto no es una tarea fácil, ya que la naturaleza variada del medio ambiente, el posible organismo diana, la matriz, los niveles de detección, los requisitos de tiempo y la disponibilidad de tecnología adecuada suponen desafíos particulares para la correcta detección y cuantificación (Turner et al., 2015). Por todo ello, existe todavía la necesidad de desarrollar y validar métodos analíticos con alta sensibilidad para la determinación a bajas concentraciones en diferentes matrices biológicas, que minimicen el uso de disolventes y material de laboratorio, para lograr una automatización completa que reduzca el tiempo total del proceso.

Los criterios fundamentales que deben seguirse en el proceso analítico de detección de estos metabolitos secundarios son (Turner et al., 2015): i) **Múltiples cepas:** mientras que la producción de estos compuestos es genotípicamente específica, se observa que el mismo compuesto puede ser producido por especies diferentes y no es una garantía de que este sea el único compuesto presente; ii) **La variedad química:** a menudo los metabolitos secretados por una especie fúngica son conocidos, sin embargo su química es muy diferente, por lo que un método genérico de extracción hace difícil su detección; iii) **Múltiples matrices:** para el análisis satisfactorio de un compuesto es necesario separar este compuesto de la matriz compleja. El mismo compuesto puede

encontrarse en matrices muy diferentes (p.e. medios de cultivos, insectos, plantas) lo que puede interferir en la separación, extracción y medida; iv) **Momento de la prueba:** el momento del análisis es crucial, esto es, la naturaleza del compuesto a determinar, así como si se evalúa *in vitro* o *in vivo*, y en este último caso, el momento del ciclo patogénico; v) **Muestreo y velocidad de las pruebas:** asegurar que se obtenga una muestra representativa es la clave de toda la estrategia analítica. Cualquier prueba que se ejecuta tiene que ser estadísticamente relevante y cada prueba debe realizarse lo más rápidamente posible; vi) **Límites de detección y cuantificación:** aunque varían significativamente dependiendo de la ubicación geográfica, el tipo de producto y el uso final del producto, los límites de detección requeridos son todavía extremadamente bajos, a menudo en partes por mil millones (ppb = $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cualquier método de detección que se considere satisfactorio debe ser capaz de detectar este nivel.

La mayoría de los métodos utilizados para la determinación de metabolitos secundarios se basan en protocolos correctos de extracción y limpieza, pues se requiere una purificación de las muestras para eliminar las sustancias que interfieren antes de proceder al análisis analítico (Frenich et al., 2011; Arroyo-Manzanares et al., 2014). Además, la existencia de procedimientos adecuados para extraer los metabolitos en diferentes matrices (medios de cultivo, insectos y plantas) es un punto clave en la evaluación de riesgos ecológicos en la cadena alimentaria (Skrobek et al., 2008, Carpio et al., 2016a). Generalmente, la técnica de extracción y limpieza empleada es la extracción en fase sólida (SPE siglas en inglés) (Wang et al., 2004; Taibon et al., 2014; Carpio et al., 2016a). Sin embargo, en los últimos años se han optimizado procedimientos modificados de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe), que inicialmente fueron desarrollados para determinar residuos de los pesticidas en diferentes matrices de alimentos (Anastassiades et al., 2003; Frenich et al., 2011; Taibon et al., 2015; Carpio et al., 2016a).

Se han utilizado diversas técnicas para detectar y cuantificar de metabolitos secundarios secretados por AMEs, entre las que se encuentran la cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), acoplada a detección de rayos ultravioleta (UV), diodos (DAD) o espectrometría de masas (MS) (Turner et al., 2015; Anfossi et al., 2016). Además,

aunque en menor medida, se ha utilizado electroforesis capilar (EC) con la que se separan los analitos en el interior de un capilar sometido a un alto campo magnético (Liu et al., 2004; Carpio et al., 2016b).

El acoplamiento HPLC-MS mediante técnicas de ionización por electro spray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI), ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de metabolitos secundarios (Arroyo-Manzanares et al., 2014). Además, mediante el empleo de MS en tándem (MS/MS) usando detectores como el triple cuádruplo (QpQ) permite la cuantificación de metabolitos en matrices complejas (Taibon et al., 2015). La UHPLC proporciona ventajas significativas en relación con LC, tales como, como mayor velocidad de análisis, resolución, sensibilidad y capacidad máxima (Frenich et al., 2011; Anfossi et al., 2016), y recientemente un híbrido cuadrupolo-Orbitrap acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap-HRMS) ofrece información de las estructuras, permitiendo la identificación y caracterización de metabolitos desconocidos (Arroyo-Manzanares et al., 2017).

3.1.1. Detección de metabolitos secundarios en medios líquidos

La selección del medio adecuado para la producción de cepas es obligatoria para la evaluación del riesgo de los metabolitos secundarios producidos por AMEs. Las cepas seleccionadas con fines comerciales se deben fermentar en aquellas condiciones de producción y medios de cultivo que permitan los niveles más bajos de metabolitos secundarios (Strasser et al., 2000a; Wang et al., 2004). Según los criterios del proyecto RAFBCA los metabolitos secundarios deben estudiarse y evaluar los riesgos en medios mínimos y completos. Medios mínimos muestran el aspecto realista, mientras que los medios completos muestran el peor de los casos donde los metabolitos pueden actuar sinérgicamente (Strasser et al., 2008). Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios en los medios de cultivo ha abierto una nueva área de investigación que podría tener importantes beneficios económicos para la industria de la fermentación (Liu y Tzeng, 2012).

Hay diversas investigaciones que se han centrado en determinar la producción de estos metabolitos por diferentes cepas en medios de cultivo diversos, como por ejemplo los metabolitos bassionalida, beauvericina, destruxina, y oosporeina (Strasser et al.,

2000b; Hsiao y Ko, 2001; Wang et al., 2004; Liu et al., 2007; Leckie et al., 2008; Xu et al., 2009; Safavi, 2013; Carpio et al., 2016b). De ellos, son las destruxinas las que han copado la mayoría de las investigaciones, que revelan en su conjunto la gran influencia sobre su producción de la cepa, el tipo de medio donde se produce, así como las condiciones de cultivo. Sin embargo, a pesar del número de trabajos publicados sobre la producción de destruxinas en medios de cultivo, no se mantienen criterios uniformes de comparación entre ellos, lo que resulta en ocasiones en la duplicación de estudios al utilizarse diferentes medios de cultivo, pero con igual influencia sobre la fisiología del hongo. **Por otro lado, es importante seleccionar con precisión el método analítico para la detección y cuantificación de toda la gama de metabolitos secundarios producidos por una sola cepa.**

3.1.2. En plantas

En los últimos años se han descrito nuevas funciones ecológicas de los AMEs, así como su significado para la protección de cultivos, entre ellas destaca su carácter endófito, su competencia en la rizosfera, donde incluso pueden promover el crecimiento vegetal y su función como antagonistas de microorganismos fitopatógenos (Ownley et al., 2010; Han et al., 2013; Quesada-Moraga et al., 2014; Lozano-Tovar et al., 2015). Además, se ha enfatizado la necesidad de comprender mejor la asociación entre hongos entomopatógenos y plantas, así como esclarecer si secretan metabolitos en ellas pues confieren protección contra patógenos de plantas y plagas de insectos (Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010).

Respecto al destino de los metabolitos secundarios producidos por AMEs endófitos en plantas hay aún gran incertidumbre, y sólo unos pocos estudios han abordado su detección. La oosporeína es el único metabolito secundario producido por tres cepas comerciales del hongo entomopatógeno *B. brongniartii* en cultivos sumergidos y en granos de cebada esterilizados, mientras que ninguno de los otros metabolitos secundarios principales (bassianina, beauvericina y tenellina) se han detectado por HPLC y MS (Strasser et al., 2000b). En cuanto a los metabolitos producidos por *Metarhizium* spp., sólo las destruxinas A, B y E se han detectado en plantas de caupi, *Vigna unguiculata* L. (Fabales; Phaseoleae) inoculadas con *M. robertsii*

(Golo et al., 2014), mientras que la destruxina A ha sido cuantificada en plantas de melón, tomate y alfalfa pulverizadas con *M. brunneum* (Resquín-Romero et al., 2016; Garrido-Jurado et al., 2017). Por otro lado, un procedimiento de extracción basado en QuEChERS permitió la cuantificación de destruxinas en fresa y maíz (Taibon et al., 2015), y la combinación QuEChERS y HPLC-MS detectó y cuantificó destruxinas en patata (Carpio et al., 2016a). **La posible secreción de metabolitos secundarios por parte de los AMEs en sus asociaciones con las plantas adquiere especial relevancia para comprender el posible flujo de estos compuestos en las cadenas tróficas.**

3.1.3. En artrópodos

Los AMEs comparten la capacidad de infectar a los artrópodos por vía tegumentaria y causarles la muerte regulando de forma natural las poblaciones (Goettel et al., 2005; Roy et al., 2006; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008). Además, los agentes entomófagos, depredadores y parasitoides, pueden encontrar y consumir insectos infectados por AMEs en cuyo caso se exponen no sólo al inóculo fúngico, sino también a diferentes metabolitos secundarios secretados en el insecto hospedante por el hongo (Roy y Pell, 2000; Rohlf y Churchill, 2011; Rodrigues de Castro et al., 2013, Resquín-Romero et al., 2016). Por tanto, **deben desarrollarse y validarse urgentemente metodologías para la evaluación del riesgo ecotoxicológico y herramientas analíticas para la detección y cuantificación de metabolitos secundarios a nivel de trazas, con el fin de supervisar esos metabolitos en la cadena alimentaria, que requieren detección y cuantificación no sólo en los fitófagos, sino también en los insectos no diana, sobre todo en los beneficiosos, y en las plantas** (Strasser et al., 2000a). **A pesar de la evidencia existente sobre el papel de los metabolitos secundarios en la patogeneidad y virulencia de AMEs, existe una carencia de estudios sobre la dinámica del crecimiento fúngico y la secreción de estos compuestos durante la infección de insectos por los mismos.** Algunos estudios han detectado destruxina A en insectos sin aportar detalles sobre los parámetros de validación tales como el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), la tasa de recuperación del analito y precisión para permitir el análisis comparativo (Kershaw et al., 1999; Amiri et al., 2000). Sólo Skrobek et al. (2008) ofrece esta información en la detección *in vivo* y cuantificación de la destruxina A usando HPLC-DAD con límites de detección y cuantificación y niveles de recuperación

que podrían mejorarse usando HPLC-MS, un método de detección generalmente más sensible para tales metabolitos (Bogusz y Carracedo, 2004).

El estudio *in vivo* de la secreción de metabolitos durante la infección del insecto hospedante por AMEs podría conducir no sólo a comprender mejor su papel como factores de virulencia, sino también a cuantificar la cantidad total del mismo producida por insecto, un primer paso para controlar si estos compuestos pueden entrar en las cadenas tróficas y suponer un riesgo para los seres humanos y el medio ambiente.

3.2. Flujo de metabolitos en cadenas tróficas

Debido a las propiedades citotóxicas de los metabolitos secretados por cepas de algunas especies de AMEs, su estudio es de gran interés en procesos de análisis de riesgo ya que estos podrían entrar en las cadenas tróficas y presentar un riesgo para los humanos. El conocimiento sobre el destino y el comportamiento de los metabolitos secundarios en el medio ambiente podría situar definitivamente a los AMEs como elementos clave para garantizar la calidad y seguridad alimentaria (Strasser et al., 2000a). Sin embargo, **la información sobre el destino de los metabolitos secundarios producidos por estos hongos en la cadena alimentaria (planta-herbívoro-depredador) y su riesgo para la salud humana y animal es aún escasa, si es que existe, una cuestión que debe abordarse con precisión** (Strasser et al., 2011; Mudgal et al., 2013; Garrido-Jurado et al., 2017). Para ello, **deben desarrollarse y validarse metodologías para la evaluación del riesgo ecotoxicológico y herramientas analíticas para la detección y cuantificación de metabolitos secundarios a nivel de trazas, con el fin de evaluar su posible presencia en la cadena alimentaria, lo que hace urgente su cuantificación en plantas e insectos** (Strasser et al., 2000a). Además, **la existencia de procedimientos adecuados para extraer los metabolitos en diferentes matrices (medios de cultivo, insectos y plantas) es un punto clave en la evaluación de riesgos ecotoxicológicos en la mencionada cadena** (Skrobek et al., 2008; Carpio et al., 2016a). Por todo ello, es necesario proporcionar datos valiosos para comprender mejor el papel de los metabolitos secretados por los AMEs como factores de virulencia y para controlar el destino de estos compuestos en las cadenas tróficas. A este respecto, los objetivos de

esta Tesis Doctoral se ajustan a los encomendados al Grupo de Investigación PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” de la Universidad de Córdoba dentro del mencionado proyecto del VII Programa Marco de la UE INBIOSOIL, *Innovative biological products for soil pest control* (282767. FP7-ENV-2011-3.1.9.-1 ECO-INNOVATION-TwoStage/CP), esto es, la validación de los protocolos propuestos por el proyecto RAFBCA para el análisis de la producción de los metabolitos secundarios clave en varias cepas de AMEs, en especial del género *Metarhizium* spp. que ya se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo comercial, y una vez desarrollados y validados estos protocolos, su empleo para estudiar el posible flujo de estos metabolitos en las cadenas tróficas. El proyecto ha dedicado especial atención a **dos cepas de *M. brunneum*, BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su**, que ya han mostrado eficacia para distintas plagas de insectos geobiontes y geófilos, y para las que es necesario generar la requerida información de secreción de destruxinas, no sólo a efectos de registro, sino para caracterizar su estrategia patogénica.

4.-Objetivos

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son:

1. Determinar y cuantificar las destruxinas secretadas por cepas seleccionadas de *Metarhizium* spp. en diferentes medios de cultivo líquido que ofrecen al hongo diferentes tipos de estrés durante su crecimiento.
2. Detectar y cuantificar la destruxina A en muestras vegetales obtenidas de plantas de patata colonizadas endofíticamente por las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *Metarhizium brunneum* Petch.
3. Detectar y cuantificar la destruxina A durante el proceso patogénico de las cepas de *M. brunneum*, BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su en larvas del insecto modelo *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) y su relación con la cantidad de ADN del hongo durante el mismo.
4. Investigar el posible flujo de la destruxina A desde la presa, larvas del insecto polífago *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera; Noctuidae) infectadas por las cepas de *M. brunneum*, BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su, al depredador, larvas de *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera; Chrysopidae) que se alimentan de las mismas, así como determinar si la infección de la presa tiene influencia sobre el comportamiento y supervivencia del depredador.

Los resultados relativos al primer objetivo se recogen en el capítulo II, que comprende el manuscrito “Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS”, publicado en la revista *Biocontrol Science and Technology* 26 (2016): 1298-1311 [Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en “Entomology”]. Los resultados del objetivo dos se recogen en el capítulo III titulado “Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*”, publicado en la revista *Biocontrol Science and Technology* 26 (2016): 1574-1585 JCR [Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en “Entomology”]. Los resultados relativos al tercer objetivo corresponden al capítulo IV titulado “Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*” en prensa en la revista *Journal of Invertebrate Pathology* DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007 JCR [Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en “Zoology”]. El objetivo cuarto queda recogido en el capítulo V titulado “Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae)”, recientemente aceptado con “Major Revision” en la revista *Journal of Pest Science* JCR [Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en “Entomology”].

5. Referencias

- Aira MJ, Jato V, Stchigel AM, Rodríguez-Rajo FJ, Piontelli E. 2007. Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation* 60: 231-237.
- Alabouvette C, Cordier Ch. 2011. Risk of Microbial Biocontrol Agents and Regulation: Are They in Balance? En: Ehlers, RU. (ed.), *Regulation of Biological Control Agents*. Springer Netherlands pp 154-173.
- Amiri B, Ibrahim L, Butt TM. 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metharizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology* 9: 487-498.
- Amiri B, Khambay B, Cameron S, Deadman ML, Butt TM. 2000. Inter-and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological Research* 104: 447-452.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 1217: 2548-2560.
- Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. 2016. Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology* 37: 120-126.
- Arroyo-Manzanares N, Di Mavungu JD, Garrido-Jurado I, Arce L, Vanhaecke L, Quesada-Moraga E, De Saeger S. 2017. Analytical strategy for determination of known and unknown destruxins using hybrid quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409: 3347-3357.
- Arroyo-Manzanares N, Huertas-Pérez JF, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín GRASEQA* 7: 16-31.
- Badii MH, Abreu. JL. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.
- Bartlett MC, Jaronski ST. 1988. Mass production of entomogenousfungi for biological control of insects. En: Burge MN. (ed) *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester pp 61-85.
- Bogusz MJ, Carracedo A. 2004. Forensic analysis. *Journal of Chromatography Library* 69: 1073.
- Bruck D. 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl* 55: 103-112.
- Bryden WL. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173: 134-158.
- Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy MI, Ratcliffe NA. 2016. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics* 94: 307-364.
- Carpio A, Arroyo-Manzanares N, Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Gámiz-Gracia L, García-Campaña, AM, Quesada-Moraga E, Arce L. 2016a. Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC-MS/MS. *Talanta* 146: 815-822.

- Carpio A, Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E, Arce L. 2016b. Capillary Electrophoresis as a Promising Technique to Evaluate Metabolites Secreted by Fungal Biocontrol Agents. *Chromatographia* 79: 481-489.
- Chandler D, Davidson G, Grant WP, Greaves J, Tatchell GM. 2011. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends in Food Science and Technology* 19: 275-283.
- Charnley AK, Collins SA. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Kubicek CP, Druzhinina, IS. (Eds.) *Environment and microbial relationships*. 2nd Edition, *The Mycota IV*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 159-185.
- Charnley AK. 2003. Fungal Pathogens of Insects: Cuticle-degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical Research* 40: 241-321.
- Cooping LG, Menn JJ. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science* 56: 651-676.
- Cory JS, Ericsson JD. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl* 55: 75-88.
- Ehlers RU. 2008. Regulation of microbial biocontrol agents in Europe-Results of the REBECA Policy Support Action. *IOBC/wprs Bulletin* 31: 18-17.
- Ehlers RU. 2011. Regulation of microbial biocontrol agents in Europe-Results of the REBECA. En: Ehlers RU. (ed.), *Regulation of Biological Control Agents*. Springer Netherlands pp 3-24.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- European Food Safety Authority. 2013. The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* 11: 3130 DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3130.
- European Food Security Agency. 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 15: 4791 DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4791.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2016. *El estado actual de la agricultura y la alimentación* 214 pp.
- Faria MR, Wraight SP. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20: 767-778.
- Faria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43: 237-256.
- Fisher JJ, Rhener SA, Bruck DJ. 2011. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 289-295.
- Frenich AG, Romero-González R, Pérez-Gómez ML, Martínez-Vidal JL. 2011. Multi-micotoxin analysis in eggs a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 4349-4356.

- Garrido-Jurado I, Alkhaibari A, Williams SR, Oatley-Radcliffe DL, Quesada-Moraga E, Butt TM. 2016. Toxicity testing of *Metarhizium* conidia and toxins against aquatic invertebrates. *Journal of Pest Science* 89: 557-564.
- Garrido-Jurado I, Fernández-Bravo M, Campos C, Quesada-Moraga E. 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate pathology* 130: 97-106.
- Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Amarilla SP, Ríos-Moreno A, Carrasco L, Quesada-Moraga E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi foliar applications for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science* 90: 319-330.
- Garrido-Jurado I, Torrent J, Barrón V, Corpas A, Quesada-Moraga E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58: 277-285.
- Geddes AJ, Akrigg D. 1976. The Crystal Structure of Hydrated Beauvericin. *Acta Crystallographica B* 32: 3164-3171.
- Gill HK, Garg H. 2014. Pesticide: Environmental Impacts and Management Strategies. En: Solenski S, Larramendy ML. (Eds.) *Pesticides-Toxic Effects*, Intech, Rijeka pp 187-230.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327: 812-818.
- Goettel MS, Eilenberg J, Glare T. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. En: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS. (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam pp 361-405.
- Golo PS, Gardner DR, Grilley MM, Takemoto JK, Krasnoff SB, Pires MS, Fernandes EKK, Bittencourt VR, Roberts DW. 2014. Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. *PLoS One* 9: e104946.
- Gryganskyi AP, Humber RA, Smith ME, Miadlikovska J, Wu S, Voigt K, Walther G, Anishchenko IM, Vilgalys R. 2012. Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 682-694.
- Gryganskyi AP, Humber RA, Smith ME, Hodge K, Huang B, Voigt K, Vilgalys R. 2013. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia* 30: 94-105.
- Hajek A. 2004. *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge, UK: Cambridge University Press 378 pp.
- Han PF, Jin FL, Dong XL, Fan JQ, Qiu BL, Ren SX. 2013. Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PLoS ONE* 8: e60771.
- Hesketh H, Roy HE, Eilenberg J, Pell JK, Hails RS. 2010. Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl* 55: 55-73.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer

- R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.
- Hsiao YM, Ko JL. 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, Li F, Zhang Y. 2016. Risks of Mycotoxins from Mycoinsecticides to Humans. *BioMed Research International*. ID 3194321 13 pp.
- Humber RA. 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon* 120: 477-492.
- Hussain A, Rizwan-ul-Hag R, Al-Ayedh H, Al-Jabr AM. 2014. Mycoinsecticides: Potential and Future Perspective. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture* 6: 45-53.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insects pest. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N. (Eds.), *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. CABI publishing, Wallingford, UK pp 23-70.
- Inglis GD, Johnson DL, Goettel MS. 1996. Effects of temperature on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *Biological Control* 7: 131-139.
- Jackson MA, Dunlap ChA, Jaronski ST. 2010. Ecological consideration in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55: 129-145.
- Jackson MA, Schisler DA. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied Environmental Microbiology* 58: 2260-2265.
- Jackson MA. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 180-187.
- Jaronski ST. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 159-185.
- Kabaluk T, Goettel M, Erlandson M, Ericsson J, Duke G, Vernon B. 2005. *Metarhizium anisopliae* as a biological control for wireworms and a report of some other naturally-occurring parasites. *IOBC/wprs Bulletin* 28: 109-115.
- Kandhai MC, Booij CJH, Van der Fels-Klerx HJ. 2011. Expert Study to Select Indicators of the Occurrence of Emerging Mycotoxin Hazards. *Risk Analysis* 31: 160-170.
- Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 213-223.

- Khachatourians GG, Qazi SS. 2008. Entomopathogenic fungi: Biochemistry and Molecular Biology. En: Brackage AA. (ed.) *The Mycota VI: Human and Animal Relationships* Springer Heidelberg pp 33-61.
- Kodaira Y. 1961. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agricultural and Biological Chemistry* 25: 261-262.
- Köhler HR, Triebkorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341: 759-765.
- Krasnoff SB, Keresztes I, Gillilan RE, Szebenyi DME, Donzelli BGG, Churchill ACL, Gibson DM. 2007. Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Natural Products* 70: 1919-1924.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1-41.
- Lacey LA. 2017. Entomopathogens used as microbial control agents. En: Lacey L. (Eds.), *Microbial control of insect and mite pests*. Academic Press, Yakima, WA, USA pp 3-12.
- Leckie BM, Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Jones CJ, Gwinn KD. 2008. Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 18: 697-710.
- Liu BL, Rou TM, Rao YK, Tzeng YM. 2007. Effect of pH and aeration rate on the production of destruxins A and B from. *International Journal of Applied Science and Engineering* 1: 17-26.
- Liu BL, Tzeng YM. 2012. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances* 30: 1242-1254.
- Liu Ch, Huang Sh, Tzeng YM. 2004. Analysis of destruxins produced from *Metarhizium anisopliae* by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science* 42: 140-144.
- Love BE, Bonner-Stewart J, Forrest LA. 2009. An efficient synthesis of oosporein. *Tetrahedron Letters* 50: 5050-5052.
- 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 of Economic Entomology* 108: 462-472.
- Lozano-Tovar MD, Raya-Ortega MC, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E, Trapero-Casas A. 2017. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. *Crop Protection*. En prensa.
- Meyling NV, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-55.
- Meyling NV, Lubeck M, Buckley EP, Eilenberg J, Rehner SA. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* 18: 1282-1293.

- Molnár I, Gibson DM, Krasnoff SB. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports* 27: 1241-1275.
- Mudgal S, De Toni A, Tostivint C, Hokkanen H, Chandler D. 2013. Scientific support, literature review and data collection and analysis for risk assessment on microbial organisms used as active substance in plant protection products –Lot 1 Environmental Risk characterization. EFSA supporting publication 2013: EN-518.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 267-270.
- Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113-128.
- Pal S, St. Ledger RJ, Wu LP. 2007. Fungal peptide Destruxin A plays a Specific Role in Suppressing the Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 8969-8977.
- Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59: 579-596.
- Pell JK, Hannam JJ, Steinkraus DC. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 187-198.
- Quesada-Moraga E, Campos-Aranda M, Santiago-Álvarez C. 2009. Control de plagas. En: Junta de Andalucía (Eds.), *Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía*, Junta de Andalucía, Córdoba, España pp 189-225.
- Quesada-Moraga E, Herrero-Asensio N, Zabalgoeazcoa I. 2014. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. En: Verma VC, Gange AC. (Eds.), *Advances in endophytic research*, Springer, India pp 85-99.
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and agricultural soils. *Mycological Research* 111: 947-966.
- Quesada-Moraga E, Santiago-Álvarez C. 2008. Hongos Entomopatógenos. En: Urbaneja A, Jacas J. (Eds.), *Control biológico de plagas*. Phytoma y Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, Navarra, España pp 98-120.
- Quesada-Moraga E. 2013. Tendencias en sanidad vegetal. Nuevas y sorprendentes aplicaciones de los hongos entomopatógenos en sanidad vegetal. *Phytoma*, España 250: 72-73.
- Råberg L, Graham AL, Read AF. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 364: 37-49.
- Ravensberg WJ. 2011. Registration of Microbial Pest Control Agents and Products and Other Related Regulations. En: *A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods*. Springer Netherlands pp 171-233.
- Resquín-Romero G, Garrido-Jurado I, Delso C, Ríos-Moreno A, Quesada-Moraga E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of micoinsecticides against chewing insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23-31.

- Rodrigues de Castro T, Saldarriaga-Ausique JJ, Nunes DH, Ibanhes FH, Delalibera J. 2013. Risk assessment of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* on the predatory mites *Euseius concordis* and *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 59: 421-433.
- Rohlf M, Churchill ACL. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology* 48: 23-34.
- Roy HE, Pell JK. 2000. Interactions Between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implications for Biological Control. *Biocontrol Science and Technology* 10: 737-752.
- Roy HE, Steinkraus DC, Eilenberg J, Hajek AE, Pell JK. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology* 51: 331-357.
- Safavi SA. 2013. *In Vitro* and *In Vivo* Induction, and Characterization of Beauvericin Isolated from *Beauveria bassiana* and Its Bioassay on *Galleria mellonella* Larvae. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 1-10.
- Sánchez-Rodríguez AR, Barrón V, Del Campillo, MC, Quesada-Moraga E. 2016. The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: a tool for alleviating Fe chlorosis. *Plant and Soil* 406: 295-310.
- Sánchez-Rodríguez AR, Del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Scientia Horticulturae* 197: 193-202.
- Santini A, Rosalia F, Meca G, Ritieni A. 2009. Overview of analytical methods for beauvericin and fusaproliferin in food matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 1253-1260.
- Sbaraini N, Muniz Guedes RL, Carrer Andreis F, Junges A, Loss de Moraes G, Vainstein MH, Ribeiro de Vasconcelos AT, Schrank A. 2016. Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. *BMC Genomics* 17: 399-417.
- Scheepmaker JWA, Butt TM. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology* 20: 503-552.
- Schrank A, Vainstein MH. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274.
- Seger C, Erlebach D, Stuppner H, Griesser HU, Strasser H. 2005. Physicochemical properties of oosporein, the major secreted metabolite of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Helvetica Chimica Acta* 88: 802-810.
- Sieglwart M, Graillot B, Blachere Lopez C, Besse S, Bardin M, Nicot PC, Lopez-Ferber M. 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in Plant Science* 6: 381.
- Skrobek A, Boss D, Defago G, Butt TM, Maurhofer M. 2006. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. *Toxicology Letters* 161: 43-52.

- Skrobek A, Shah FA, Butt TM. 2008. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* 53: 361-373.
- Smits N, Rougier M, Fargues J, Goujet R, Bonhomme R. 1996. Inactivation of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia by diffuse and total solar radiation. *Fems Microbiology Ecology* 21: 167-173.
- Strasser H, Vey A, Butt TM. 2000a. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyposcladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10: 717-735.
- Strasser H, Abendstein D, Stuppner H, Butt TM. 2000b. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research* 104: 1227-1233.
- Strasser H, Hutwimmer S, Burgstaller W. 2011. Metabolite toxicology of fungal biocontrol agents. En: Ehlers RU. (ed.), *Regulation of Biological Control Agents*. Springer Netherlands pp 191-214.
- Strasser H, Pernfuss B. 2005. What have BIPESCO and RAFBCA achieved that could help with risk assessment and registration? *IOBC/wprs Bulletin* 28: 189-192.
- Strasser H, Typas M, Altomare C, Butt MT. 2008. Proposal on the assessment of microbial metabolites. In *Europe-Results of the REBECA Policy Support Action*. *IOBC/wprs Bulletin* 31: 21-26.
- Strauch O, Hermann S, Hauschild R, Ehlers RU. 2011. Proposals for bacterial and fungal biocontrol agents. En: Ehlers RU. (Ed.), *Regulation of Biological Control Agents*. Springer, Netherlands pp 267-288.
- Sundh I, Goettel MS. 2013. Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and microbial agents. *BioControl* 58: 575-593.
- Taibon J, Sturm S, Seger C, Parth M, Strasser H, Stuppner H. 2014. Development of a fast and selective UHPLC-DAD-QTOF-MS/MS method for the qualitative and quantitative assessment of destruxin profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406: 7623-7632.
- Taibon J, Sturm S, Seger C, Strasser H, Stuppner H. 2015. Quantitative Assessment of Destruxins from Strawberry and Maize in the Lower Parts per Billion Range: Combination of a QuEChERS-Based Extraction Protocol with a Fast and Selective UHPLC-QTOF-MS Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 5707-5713.
- Thomas MB, Read MF. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology* 5: 377-383.
- Turner WN, Bramhmbhatt H, Szabi-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky SA. 2015. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Analytica Chimica Acta* 901: 12-33.
- Uchida R, Imasato R, Yamaguch Y, Masuma R, Shiomi J, Tomoda H, Omura S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxi fungerins A and B produced by *Metarhizium* sp., FKI-1075. *The Journal of Antibiotics* 58: 804-809.





- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzon A, Ownley B, Pell J, Rangel DE, Roy HE. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159.
- Vega FE, Jackson MA, McGuire MR. 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia* 147: 33-35.
- Vey A, Hoagland R, Butt TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N, (Eds.) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford, UK pp 311-346.
- Vey A. 1998. Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and sustainable agriculture. *IOBC Bulletin* 21: 71-76.
- Vilcinskis A, Matha V, Gotz P. 1997. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomopathogenic fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology* 43: 475-483.
- Wang B, Kang Q, Lu Y, Baib L, Wang C. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings National Academy Science USA* 109: 1287-1292.
- Wang Ch, Skrobek A, Butt TM. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 168-174.
- Wang JB, St. Leger RJ, Wang C. 2016. Advances in genomics of entomopathogenic Fungi. *Advances in Genetics* 94: 67-105.
- Wang QG, Xu LJ. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 173: 2367-2377.
- Xu QX, Orozco R, Wijeratne EMK, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka LAA, Stock PS, Molnár I. 2009. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 353-364.
- Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ, Pye BJ. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59: 156-165.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 879-920.

BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2016
VOL. 26, NO. 9, 1298-1311
<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1195336>



RESEARCH ARTICLE

Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS

A. Ríos-Moreno^a, A. Carpio^b , I. Garrido-Jurado^a , N. Arroyo-Manzanares^c, M. D. Lozano-Tovar^a, L. Arce^b , L. Gámiz-Gracia^c, A. M. García-Campaña^c and E. Quesada-Moraga^a 

^aDepartment of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Cordoba, Spain;

^bDepartment of Analytical Chemistry, University of Cordoba, Cordoba, Spain; ^cDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada, Spain

Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS

Authors: A. Ríos-Moreno, A. Carpio, I. Garrido-Jurado, N. Arroyo-Manzanares, M.D. Lozano-Tovara, L. Arce, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, E. Quesada-Moraga.

Abstract

Entomopathogenic fungi, in particular the genus *Metarhizium*, have shown a success in the control of insect pests. However, only a few of them have been commercialized mainly due to problems associated with the registration schedule, with emphasis on the lack of mandatory specific data requirements for the detection of secondary metabolites. In this study destruxin production for *Metarhizium* strains BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, ARSEF 23 and ART 2825 was determined with an improved method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), which has shown high precision in the detection and quantification of destruxins in four culture media (CM, MM, CN₂, OSM) representing different stress conditions. Every 3 days samples were taken for analysis over 18 days that allowed detecting 15 destruxins, with destruxin A and B as the most abundant. However, very significant differences among strains in destruxins production were detected, and for each strain, destruxins production was highly dependent on culture medium, which highlights that the selection of a suitable medium for the strain production for the risk assessment of secondary metabolites produced by entomopathogenic fungi is mandatory.

Keywords: BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, ARSEF 23, ART 2825, entomopathogenic fungi, culture media, metabolites.




CAPÍTULO III

BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2016
VOL. 26, NO. 11, 1574–1585
<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1223274>



RESEARCH ARTICLE

Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*

A. Ríos-Moreno^a, I. Garrido-Jurado^a , G. Resquín-Romero^a, N. Arroyo-Manzanares^b, L. Arce^b  and E. Quesada-Moraga^a 

^aDepartment of Agricultural and Forestry Sciences, ETSIAM, University of Cordoba, Cordoba, Spain;

^bDepartment of Analytical Chemistry, University of Cordoba, Cordoba, Spain

Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*

Authors: A. Ríos-Moreno, I. Garrido-Jurado, G. Resquín-Romero, Arroyo-Manzanares, N., L. Arce, E. Quesada-Moraga.

Abstract

Metarhizium spp. is known to produce destruxin A and can act as an endophyte. Data regarding the fate and behaviour of secondary metabolites in the environment is necessary for registration. Endophytic colonisation and destruxin A production on potato plants were monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h after inoculation with *Metarhizium brunneum* strains (BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su). Both strains were recovered from leaves, stem, tuber and root fragments of fungal-challenged potato plants. Although a similar colonisation was observed for both strains, there were differences in percentages in different parts of the plants, with the higher values occurring in the leaves at 96 h for EAMa 01/58-Su (83.3 %) and BIPESCO5 (81.6 %), and the lower ones, 10-13.3 %, observed in tuber and root at 72, 96 and 120 h post-inoculation for both strains. For strain EAMa 01/58-Su, destruxin A was quantified at 24 h (2.49 ± 1.7 and 2.0 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively), and the same concentration was found in both tuber and root at 96 h (2.5 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$); for BIPESCO5, the concentrations differed in tuber at 24 h and in root at 48 h (6.8 ± 4.8 and 2.1 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively). The concentration of destruxin A in plant tissues was very low compared to the colonisation levels, suggesting that destruxin A production by the fungus may be temporary and that the compound might degrade rapidly.

Keywords: BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, endophytic fungi, metabolites

CAPÍTULO IV

Accepted Manuscript

Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*

A. Ríos-Moreno, I. Garrido-Jurado, M.C. Raya-Ortega, E. Quesada-Moraga

PII: S0022-2011(16)30247-6

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.007>

Reference: YJIPA 6961

To appear in: *Journal of Invertebrate Pathology*



Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*

Authors: A. Ríos-Moreno, I. Garrido-Jurado, M. C. Raya-Ortega and E. Quesada-Moraga

Abstract

Destruxin A is among the major secondary metabolites produced by the entomopathogenic ascomycete *Metarhizium* spp., and the lack of studies concerning production of destruxin A by the fungus is most likely the biggest obstacle for registration of new fungal strains. Although several studies focus on the production of destruxin A in culture media, few studies examine destruxin A *in vivo* during host infection. In the current work, *Galleria mellonella* was used as an insect model to develop for the first time *in vivo* real-time PCR and HPLC-MS-based quantification of fungal growth and metabolite production, respectively, during infection by two strains of *M. brunneum*. Total mortality of sixth instar *G. mellonella* larvae that were immersed in a suspension of 1.0×10^8 conidia mL^{-1} of *M. brunneum* EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 strains reached 85.5 % and 78.8 %, respectively, and the percentage of cadavers with fungal outgrowth were low at 12.2 % and 4.4 %, respectively. The average survival time of treated larvae was 5.5 days for both fungal strains. Using EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 specific primer set, real-time PCR showed that the patterns of fungal growth were different for the two strains, whereas no significant differences were detected in the number of fungal sequence copies recovered from the infected larvae. EAMa 01/58-Su and BIPESCO5 strains secreted destruxin A from days 2 to 6 and from day 2 to day 5 post treatment, respectively. For EAMa 01/58-Su and BIPESCO5, the maximum titer in the host was on day 4 of 0.369 and 0.06 $\mu\text{g}/\text{larva}$, respectively, and throughout the pathogenic process, the production was 0.6 and 0.09 $\mu\text{g}/\text{larva}$, respectively. These results

demonstrated that the strains pose a low hazard, if any, to humans and the environment. The methods used in this study to quantify fungal growth and metabolite production provided valuable data to better understand the role of destruxin A during the growth of *M. brunneum* in the host larvae and to monitor the fate of destruxin A in the food chains.

Keywords: Real-time PCR, HPLC-MS, BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, mode of action, risk assessment

CAPÍTULO V

Artículo: Aceptado con “Major Revision” en Journal of Pest Science.

Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae)

Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae)

Authors: A. Ríos-Moreno, E. Quesada-Moraga, I. Garrido-Jurado

Abstract

Metarhizium spp. (Hypocreales; Clavicipitaceae) are used as alternatives to hazardous pesticides. During host infection, they secrete secondary metabolites such as destruxin A. Information on the fate of those secondary metabolites in the food chain and their risk to human and animal health is scarce. In the present work, predator-prey bioassays were performed to evaluate the behavior and survival of green lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae) larvae when presented on armyworms *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera; Noctuidae) larvae treated by *M. brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains. Moreover, ecotoxicological studies were done using HPLC-MS to monitor the fate of destruxin A in the prey-predator system. HPLC-MS confirmed the presence of destruxin A at low concentrations in *S. littoralis* larvae infected with BIPESCO5 (approximately 0.014 µg/g) and EAMa 01/58-Su (approx 0.031 µg/g) strains, whereas the metabolite was not detected in *C. carnea* larvae consuming *M. brunneum*-treated *S. littoralis* larvae. Furthermore, *C. carnea* larvae preferentially fed on healthy prey versus *M. brunneum*-treated prey as revealed by both the higher predator ratio feeding on *S. littoralis* control larvae and the higher *per capita* number of control larvae consumed by the predator compared to *M. brunneum*-treated larvae. Moreover, this preference was inversely related to the post inoculation period of *S. littoralis* larvae treated with *M. brunneum*. Besides, *C. carnea* larvae fed on healthy prey gained more weight than on the treated one. Both *M. brunneum* treatments used against *S. littoralis* larvae were low risk for *C. carnea* due to the lack of fungus-related mortality in the predator, and the lack of movement of destruxin A from the prey to the predator. However, further studies on other non-targets

and with more strains of *M. brunneum* are needed to evaluate their possible simultaneous use in Integrated Pest Management.

Keywords: Destruxin A, HPLC-MS, risk assessment, green lacewing

CAPÍTULO VI: Discusión General

Existen distintas cepas de AMEs del género *Metarhizium* que han mostrado un gran éxito en el control de plagas de insectos, aunque sólo algunas se han convertido en micoinsecticidas comerciales, debido principalmente a problemas relacionados con el largo proceso de registro y los costes asociados, sin olvidar la ausencia de protocolos específicos para la detección de metabolitos secundarios y su efecto sobre organismos no diana (Strasser et al., 2011; Sundh y Goettel, 2013; Garrido-Jurado et al., 2016). Las autoridades reguladoras requieren datos sobre el posible riesgo de estos metabolitos para la salud humana y animal, pero hasta ahora las estrategias para la toma de decisiones en la evaluación del riesgo de estos agentes de control biológico son muy limitadas y dependientes de los protocolos para evaluar insecticidas químicos (Skropek et al., 2008; Strasser et al., 2011). Además, la información sobre el posible flujo de estos metabolitos secundarios en la cadena alimentaria y su riesgo para la salud humana y animal es muy escasa. El conocimiento sobre el destino de estos compuestos y su comportamiento en el medio ambiente aportaría datos claves para convertir a los AMEs, dentro del control microbiano de plagas, en una de las mejores alternativas para garantizar la calidad y seguridad alimentarias (Strasser et al., 2000).

Las destruxinas son los metabolitos secundarios más abundantes producidos por el género *Metarhizium* y comprenden una familia formada por 40 derivados (Arroyo-Manzanares et al., 2017). Especialmente, la destruxina A es un metabolito clave en la evaluación del riesgo ecotoxicológico del empleo de *Metarhizium* para el control de plagas de insectos, ya que posee actividad insecticida (Hu et al., 2007), citotóxica (Vey et al., 2002) y desempeña papeles críticos en la patogénesis (Amiri et al., 1999; Pedras et al., 2002; Sowjanya et al., 2008; Hu et al., 2009). Por ello, la destruxina A se muestra como un metabolito fundamental, que podría entrar en el suministro de alimentos y presentar un riesgo para los seres humanos y animales. Por otro lado, se necesitan metodologías analíticas sólidas que proporcionen información sobre la cantidad de destruxinas producidas por las diferentes cepas de *Metarhizium* utilizadas como bioinsecticidas, tales como las incluidas en los objetivos del proyecto INBIOSOIL, que han sido las utilizadas en la presente Tesis Doctoral. En este sentido, es importante disponer de procedimientos adecuados para extraer estos metabolitos en las diferentes matrices presentes a lo largo de la cadena alimentaria.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que las cepas del género *Metarhizium* seleccionadas secretan destruxinas, especialmente destruxina A, en diferentes matrices (medios de cultivo, plantas e insectos), que se pueden detectar y cuantificar hasta nivel de trazas por medio de las metodologías analíticas y procesos de extracción descritos en los diferentes capítulos de la misma. Además, se han aportado datos inéditos sobre la producción de destruxina A en la cadena trófica, hecho obligatorio para la evaluación del riesgo del empleo de AMEs para el control de plagas de insectos. Los resultados de esta Tesis Doctoral suponen una gran contribución para romper barreras sobre la seguridad en el uso de los AMEs en el control integrado de plagas.

En el capítulo II, se ha determinado la producción de destruxinas por parte de cuatro cepas de *Metarhizium*, BIPESCO5, EAMa 01/58-Su, ARSEF 23 y ART 2825, con un método mejorado de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) en cuatro medios de cultivo que representan diferentes condiciones de estrés, condición normal (CM), estrés nutricional (MM), estrés por déficit de carbono (CN₂) y estrés osmótico (OSM). Utilizando HPLC-MS / MS se detectaron 15 destruxinas (A, B, C, D, E, Ed, Ed₁, A₂, B₂, D₂, E₂, CL, DesmA, DesmA, DHA) en los medios de fermentación. La producción de destruxinas varió considerablemente de acuerdo con la cepa y el medio de cultivo, hecho que ya había sido previamente observado por otros autores con otras cepas de esta especie fúngica y distintos medios de cultivo (Chen et al., 1999; Amiri et al., 2000; Wang et al., 2004; Hu et al., 2006). En todos los casos, las destruxina A y B fueron los principales metabolitos secundarios, con valores de concentración más altos que los de otras destruxinas, lo que corrobora estudios previos de otros autores con idénticos resultados (Kershaw et al., 1999, Hsiao y Ko 2001, Wang et al., 2004). La producción de destruxinas dependió de la cepa y el medio de cultivo, sin embargo, se mostró independiente del pH y la biomasa. La producción de destruxinas A y B en las cepas ARSEF 23, EAMa 01/58-Su y ART 2825 se vio favorecida según la siguiente clasificación de los medios de cultivo OSM> CM> CN₂> MM. En el caso de BIPESCO5, el orden de los medios de cultivo que promovieron la producción de destruxina A fue OSM> CN₂> CM> MM y para la destruxina B OSM> CN₂> MM> CM. El procedimiento analítico empleado en este capítulo ha mostrado una gran

sensibilidad en la determinación de estos metabolitos secundarios hasta el nivel de $\mu\text{g/L}$, lo que adquiere especial importancia para el caso de las destruxinas minoritarias. Los datos aportados en el capítulo II indican que la correcta elección del medio de cultivo para la producción de cepas de *Metarhizium* debería ser obligatorio en los estudios de evaluación del riesgo de los metabolitos producidos por AME.

En el capítulo III, las cepas de *M. brunneum* BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su se establecieron endofíticamente en plantas de patata que habían sido inoculadas por pulverización. La colonización se constató no sólo en las hojas pulverizadas, sino también en el tallo e incluso la raíz y en los tubérculos de la patata. La colonización se mantuvo en ambas cepas entre el 70 y 80 % en tallos y hojas durante la duración del experimento, respectivamente. La colonización de raíces y tubérculos se observó 72 h después de la pulverización, lo que demuestra que el hongo se mueve dentro de la planta, como ya fue descrito previamente por técnicas de biología molecular y microscopía confocal y de barrido (Landa et al., 2013; Quesada-Moraga et al., 2006; 2014). Además, el método analítico utilizado, HPLC-MS, y el proceso de extracción basado en QuEChERS permitió detectar y cuantificar la destruxina A en tubérculos y raíces de plantas de patatas pulverizadas con BIPESCO5 o EAMa 01/58-Su. Curiosamente, la destruxina A se detectó y cuantificó en tubérculos y raíces aún cuando estas partes no habían sido colonizadas, lo que sugiere que el metabolito también se transloca en la planta. Además, la concentración de destruxina A en los tejidos vegetales fue muy baja en comparación con los niveles de colonización, lo que indicaría que la producción de este metabolito por el hongo puede ser temporal y que el compuesto podría degradarse rápidamente.

Hasta la fecha existen pocos trabajos sobre la producción de destruxina A *in vivo* durante la infección del insecto hospedante, y en su mayoría para investigar su función como posible factor de virulencia. Sin embargo, la cuantificación de la cantidad total de destruxina A por insecto hospedante es un dato clave para estudiar su posible flujo en la cadena trófica. Por ello, en el capítulo IV se ha evaluado por primera vez para la ciencia la dinámica tanto del crecimiento fúngico de las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum*, como la de secreción de destruxina A durante el proceso de infección de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera; Pyralidae), para proporcionar datos sobre el

modo de acción y la evaluación de riesgo del empleo de estos hongos de cara a su registro.

En el capítulo IV, los métodos de qPCR y HPLC-MS utilizados han mostrado que estas dos cepas de *M. brunneum* secretan destruxina A en las larvas infectadas. Además, la secreción de destruxina A fue paralela a la evolución del contenido fúngico en el interior del insecto para la cepa EAMa 01/58-Su, no así para BIPESCO5. Sin embargo, la cantidad de ADN fúngico en las larvas de *G. mellonella* alcanzó niveles máximos para ambas cepas de *M. brunneum* el día 4 después del tratamiento, coincidiendo con los valores máximos de concentración de destruxina A, así como con el momento en que disminuyó drásticamente la tasa de supervivencia. Curiosamente, en ambas cepas, la mortalidad por otras causas fue mucho mayor que la mortalidad con crecimiento fúngico, como posibles representantes de la estrategia tóxica propuesta por Kershaw et al. (1999). Sin embargo, la secreción de destruxina A fue 6.7 veces mayor para EAMa 01/58-Su que para BIPESCO5, lo que sugiere que la virulencia de la primera estaba altamente relacionada con la secreción de destruxina A, mientras que la segunda podría requerir la participación de otros factores además de destruxina A durante el proceso de infección.

Finalmente, en el capítulo V, se ha investigado el posible flujo de la destruxina A desde la presa, larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera; Noctuidae) infectadas con las mayores concentraciones de las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum*, al depredador generalista *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae). Los bioensayos depredador-presa llevados a cabo para evaluar el comportamiento y la supervivencia de las larvas de *C. carnea* cuando se alimentan de larvas de *S. littoralis* infectadas por *M. brunneum* han revelado que las dos cepas seleccionadas tienen ligeros efectos negativos directos sobre el depredador, ya que existe un posible comportamiento de evasión a las presas infectadas por *M. brunneum*. Coincidiendo con los resultados del capítulo IV, la tasa de supervivencia del insecto disminuyó drásticamente en el mismo día en que se detectó la producción de destruxina A, lo que podría ser un signo de la estrategia tóxica indicada previamente en el capítulo IV. Los resultados sugieren que la secreción *in vivo* de destruxina A por ambas cepas de *M. brunneum* podría ser clave en la patogenicidad de estas frente a larvas de *S. littoralis*. Sin

embargo, la máxima concentración producida en el insecto, 0.014 y 0.031 $\mu\text{g/g}$ por BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su, respectivamente, muestra un riesgo ecotoxicológico muy bajo para el depredador *C. carnea*. En cualquier caso, estos AMEs y el depredador generalista *C. carnea* se pueden utilizar juntos en una estrategia de manejo de plagas de insectos dentro de un programa de gestión integrada de plagas, considerando que el depredador tendría preferencia por presas sanas y que la otra presa moriría como resultado de la infección por el hongo.

La evaluación de riesgos ecotoxicológicos de tratamientos con AMEs debe determinar no sólo si el inóculo fúngico se transmite desde el fitófago al depredador, sino también si existe tal movimiento para los metabolitos secundarios secretados en la presa por el hongo. El método HPLC-MS utilizado en esta Tesis Doctoral ha demostrado ser robusto, además de tener alta sensibilidad y adecuadas tasas de recuperación. Este método permitió la detección y cuantificación de la destruxina A en niveles de $\mu\text{g/L}$ en larvas *G. mellonella*, *S. littoralis* e incluso en plantas de patata colonizadas endofíticamente con las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum*. Se ha podido comprobar por primera vez que la destruxina A no fluye desde un primer nivel de alimentación, fitófago inoculado con *M. brunneum*, al siguiente, depredador alimentado con el fitófago infectado, evitando el riesgo de la biomagnificación de destruxina A.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral aportan herramientas para llevar a cabo las evaluaciones del riesgo del empleo de tratamientos de AMEs para el control de plagas mediante la realización de estudios ecotoxicológicos con el fitófago, la planta y el depredador. Además, las bajas concentraciones de destruxina A secretadas por ambas cepas ponen de manifiesto un riesgo mínimo, si existe, para la salud humana, animal y medio ambiental, resultado muy importante de cara al registro comercial de las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum*. Por último, la presente Tesis Doctoral proporciona datos valiosos para comprender mejor el papel de la destruxina A como factor de virulencia y para controlar el destino de la destruxina A en la cadena alimentaria.

Referencias

- Amiri B, Ibrahim L, Butt TM. 1999. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology* 9: 487-498.
- Amiri B, Khambay B, Cameron S, Deadman ML, Butt TM. 2000. Inter-and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological Research* 104: 447-452.
- Arroyo-Manzanares N, Di Mavungu JD, Garrido-Jurado I, Arce L, Vanhaecke L, Quesada-Moraga E, De Saeger S. 2017. Analytical strategy for determination of known and unknown destruxins using hybrid quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409: 3347-3357.
- Chen JW, Liu BL, Tzeng YM. 1999. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chromatography A* 830: 115-125.
- Garrido-Jurado I, Alkhaibari A, Williams SR, Oatley-Radcliffe DL, Quesada-Moraga E, Butt TM. 2016. Toxicity testing of *Metarhizium* conidia and toxins against aquatic invertebrates. *Journal of Pest Science* 89: 557-564.
- Hsiao YM, Ko JL. 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 QB, Ren SX, Wu JH, Chang JM, Musa PD. 2006. Investigation of destruxin A and B 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strains MaQ10. *Toxicon* 48: 491-498.
- Hu QB, Ren SX, An XC, Qian MH. 2007. Insecticidal activity influence of destruxins on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology* 131: 262-268.
- 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: 115-121.
- Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 213-223.
- Landa BB, Lopez-Diaz C, Jimenez-Fernandez D, Montes-Borrego M, Munoz-Ledesma FJ, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E. 2013. *In-planta* detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 128-138.
- Pedras MSC, Zaharia LI, Ward DE. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59: 579-596.
- Quesada-Moraga E, Landa BB, Muñoz-Ledesma J, Jiménez-Díaz RM, Santiago-Álvarez C. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathology* 161: 323-329.

- Quesada-Moraga E, Herrero-Asensio N, Zabalgoeazcoa I. 2014. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. En: Verma VC, Gange AC. (Eds.), Advances in endophytic research, Springer, India pp 85-99.
- Skrobek A, Shah FA, Butt TM. 2008. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *BioControl* 53: 361-373.
- Sowjanya KS, Padmajal V, Murthy LN. 2008. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Management Science* 64: 119-125.
- Strasser H, Vey A, Butt TM. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10: 717-735.
- Strasser H, Hutwimmer S, Burgstaller W. 2011. Metabolite toxicology of fungal biocontrol agents. En: Ehlers RU (ed.), Regulation of Biological Control Agents. Springer Netherlands pp 191-214.
- Sundh I, Goettel MS. 2013. Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and microbial agents. *BioControl* 58: 575-593.
- Wang Ch, Skrobek A, Butt TM. 2004. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 168-174.
- Vey A, Matha V, Dumas C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 177-187.

CAPÍTULO VII: Conclusiones

A lo largo de los distintos capítulos de la presente Tesis Doctoral se han obtenido una serie de conclusiones que se enumeran de forma resumida a continuación. La conclusión número 1 engloba los capítulos II-V de la tesis. La conclusión número 2 corresponde al capítulo II, "Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS", artículo publicado en la revista *Biocontrol Science and Technology* 26 (2016): 1298-1311 [Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology"]. La conclusión número 3 corresponde al capítulo III, "Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*", artículo publicado en la revista *Biocontrol Science and Technology* 26 (2016): 1574-1585. Las conclusiones 4 y 5 corresponden a los capítulos IV y V. El capítulo IV "Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*" en prensa en la revista *Journal of Invertebrate Pathology*, DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007 [Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en "Zoology"]. El capítulo V "Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae)" es un artículo aceptado con "Major Revision" en la revista *Journal of Pest Science* [Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en "Entomology"].

1. Los métodos de extracción de destruxinas secretadas por cepas seleccionadas de *Metarhizium brunneum* Petch. en medios de cultivo, insectos y plantas, así como los métodos analíticos para su medida utilizados en esta Tesis Doctoral han mostrado una alta sensibilidad para detectar y cuantificar destruxinas a bajos niveles de concentración ($\mu\text{g/L}$), lo que proporciona importante información para la evaluación de los riesgos producidos por el empleo de varios aislados del género *Metarhizium* para el control de plagas.
2. Aunque se detectaron 15 destruxinas en los medios de cultivo, la destruxina A fue la más importante en términos de concentración, seguida por la destruxina B. La producción de destruxinas dependió de la cepa y del medio de cultivo, sin efecto significativo del pH y la biomasa fúngica.

3. La concentración de destruxina A producida por las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* en plantas de patata fue muy baja en comparación con los niveles de colonización fúngica, lo que sugiere que su secreción por parte del hongo puede ser temporal y que el compuesto podría degradarse rápidamente.
4. Las bajas concentraciones de destruxina A producidas en larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) y *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera; Noctuidae) infectadas por las cepas BIPESCO5 y EAMa 01/58-Su de *M. brunneum*, ponen de manifiesto un bajo riesgo para la salud humana, animal y el medio ambiente.
5. Los tratamientos de *M. brunneum* contra la presa, larvas de *S. littoralis*, fueron seguros para el depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera; Chrysopidae), debido tanto a la falta de mortalidad causada por el hongo en el depredador como a la falta de movimiento de la destruxina A de la presa al depredador. No obstante, podría existir un efecto sobre el potencial de control biológico del depredador asociado a su preferencia por larvas sanas de la presa.

CAPÍTULO VIII: Anexos

Producción científica del doctorando durante su estancia en España.

Contribución a revistas internacionales de carácter científico (SCI):

Carpio A, Arroyo-Manzanares N, **Ríos-Moreno A**, Garrido-Jurado I, Gámiz-Gracia L, García-Campaña, AM, Quesada-Moraga E, Arce L. 2016. Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC-MS/MS. *Talanta* 146: 815-822. Factor de Impacto: 4.035, Q1 (9/75) en "Chemistry Analytical".

Carpio A, **Ríos-Moreno A**, Garrido-Jurado I, Quesada-Moraga E, Arce L. 2016. Capillary Electrophoresis as a Promising Technique to Evaluate Metabolites Secreted by Fungal Biocontrol Agents. *Chromatographia* 79: 481-489. Factor de Impacto: 1.332, Q3 (52/75) en "Chemistry Analytical".

Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Amarilla SP, **Ríos-Moreno A**, Carrasco L, Quesada-Moraga E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi foliar applications for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science* 90: 319-330. Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en "Entomology".

Resquín-Romero G, Garrido-Jurado I, Delso C, **Ríos-Moreno A**, Quesada-Moraga E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of micoinsecticides against chewing insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23-31. Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en "Zoology".

Ríos-Moreno A, Carpio A, Garrido-Jurado I, Arroyo-Manzanares N, Lozano-Tovar MD, Arce L, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Quesada-Moraga E. 2016. Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology*. 26: 1298-1311. Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology".

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*. 26: 1574-1585. (Factor de Impacto: 0.919, Q3 (48/91) en "Entomology").

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Raya-Ortega MC, Quesada-Moraga E. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*. Journal of Invertebrate Pathology. En prensa DOI: 10.1016/j.jip.2017.06.007. Factor de Impacto: 2.379, Q1 (19/162) en "Zoology".

Ríos-Moreno A, Quesada-Moraga E, Garrido-Jurado. Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58-Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera; Chrysopidae). Journal of Pest Science. Aceptado con "Major Revisión" el 19 de mayo de 2017. Factor de Impacto: 3.728, Q1 (4/91) en "Entomology".

Apportaciones científicas en congresos:

Ríos-Moreno, A, Carpio, A., Garrido-Jurado, I., Arce, L, Valcárcel, M., Quesada-Moraga, E. 2014. Evaluation of destruxin A production in four strains of *Metarhizium* by capillary electrophoresis. 47th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Mainz (Alemania) p 107 (**Póster**).

Carpio, A., Arroyo-Manzanares, N., **Ríos-Moreno, A.**, Garrido-Jurado, I., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M., Quesada-Moraga, E., Arce, L. 2015. Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC-MS/MS. 15th meeting of the WG Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests, Riga (Letonia) p 22 (**Participación Oral**).

Ríos-Moreno, A., Carpio, A., Arroyo-Manzanares, N., Lozano-Tovar, M.D., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña; A.M., Arce, L., Quesada-Moraga, E. 2015. Producción de destruxinas por cepas de *Metarhizium* bajo diferentes condiciones de estrés y su detección mediante el uso de UHPLC-MS-MS. IX Congreso Nacional de Entomología Aplicada, Valencia (España) p 221 (**Póster**).

Ríos-Moreno, A., Garrido-Jurado, I., Resquin-Romero, G., Arce, L., Quesada Moraga, E. 2016. Determination of destruxin A in potato plants after foliar spray of *Metarhizium brunneum*. 49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control Tours (Francia) p 30 (**Participación Oral**).

