



HAL
open science

Lutte biologique à base de champignons entomopathogènes du genre *Beauveria* en zone tropicale

Clara Rohrlich

► To cite this version:

Clara Rohrlich. Lutte biologique à base de champignons entomopathogènes du genre *Beauveria* en zone tropicale. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2018. Français. NNT : 2018LARE0031 . tel-04579726

HAL Id: tel-04579726

<https://theses.hal.science/tel-04579726>

Submitted on 18 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA REUNION
Faculté des Sciences et Technologies
Ecole Doctorale Sciences Technologies et Santé

UMR Peuplements végétaux et bioagresseurs en milieu tropical

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION

Discipline : Biologie des Populations

Lutte biologique à base de champignons entomopathogènes du genre *Beauveria* en zone tropicale

Par

Clara ROHRLICH

CONFIDENTIEL

Thèse soutenue le 3 octobre 2018 devant le jury composé de :

Claire NEEMA	Professeur, Montpellier SupAgro	Rapporteur
Alain RATNADASS	Chercheur HDR, Cirad Réunion	Rapporteur
Nathalie BECKER	Maître de conférences HDR, MNHN	Examineur
Stéphane POUSSIER	Professeur, Université de La Réunion	Examineur
Samuel NIBOUCHE	Chercheur HDR, Cirad Réunion	Directeur de thèse

Résumé

La lutte biologique à l'aide de champignons entomopathogènes est une des alternatives aux insecticides de synthèse. La thèse étudie la spécificité, la persistance et la dispersion de souches du genre *Beauveria* ainsi que le potentiel d'une stratégie d'utilisation innovante.

A l'aide de tests de pathogénicité, un premier volet décrit le spectre d'hôtes physiologique de trois souches commerciales de *B. bassiana* et *B. hoplocheli*. Ces travaux révèlent des différences significatives entre souches. Néanmoins, elles possèdent toutes un large spectre d'hôtes, qui permet notamment d'envisager une extension d'usage pour lutter contre les mouches des fruits.

Le second volet explore le potentiel d'une stratégie de lutte biologique ciblant spécifiquement les femelles de la mouche du melon, basée sur l'auto-dissémination de champignons entomopathogènes en utilisant les mâles comme vecteurs de spores. À l'aide d'un dispositif expérimental original, nous démontrons que la transmission de spores des mâles aux femelles lors de l'accouplement augmente significativement la mortalité des femelles.

A la Réunion, depuis 30 ans, un programme de lutte contre un ver blanc de la canne à sucre est basé sur l'utilisation de *B. hoplocheli*. Le troisième volet étudie, à l'aide de marqueurs microsatellites, la diversité génétique de *B. hoplocheli* dans un réseau de parcelles de canne à sucre sur trois ans. La diversité génétique se relève très faible et nous identifions des génotypes de souches introduites dans les années 1980. Ces résultats suggèrent que les souches introduites au début de la lutte se sont maintenues et répandues dans l'agro-système réunionnais.

Mots clés : lutte biologique, champignon entomopathogène, *Beauveria*, auto-dissémination, spécificité, persistance, *Hoplochelus marginalis*, Tephritidae.

Biological control based on entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* in tropical area

Abstract

Biological control using entomopathogenic fungi is one of the alternatives to chemical insecticides. The thesis studies the specificity, persistence and dispersion of *Beauveria* strains and the potential of an innovative use strategy.

Using pathogenicity tests, a first chapter describes the host range of three commercial strains of *B. bassiana* and *B. hoplocheli*. These studies reveal significant differences between strains. Nevertheless, they all have a broad host range, which allows considering extending their use against fruit flies.

The second chapter explores the potential of a biocontrol strategy specifically targeting females of the melon fruit fly, based on the auto-dissemination of entomopathogenic fungi using males as spore vectors. Using an original experimental design, we demonstrate that spore transmission from male to female during mating significantly increases female mortality.

In Reunion, for 30 years, a biocontrol program for a sugarcane white grub has been based on the use of *B. hoplocheli*. The third chapter investigates the genetic diversity of *B. hoplocheli* strains using microsatellite markers in a three years survey in sugarcane fields. We reveal a very low genetic diversity and identify genotypes of strains introduced in the 1980s. These results suggest that the strains introduced at the beginning of the biological control persisted and spread in the Reunion agro-ecosystem.

Keywords: biological control, entomopathogenic fungi, *Beauveria*, auto-dissemination, specificity, persistence, *Hoplochelus marginalis*, Tephritidae.

Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont permis la réalisation de cette thèse dans les meilleures conditions.

Merci à Samuel Nibouche, Laurent Costet et Isabelle Robène qui m'ont accompagnée et guidée pendant ces trois ans.

Merci à Michel Zuin, Samantha Besse et Christophe Fillon d'Arysta Lifescience.

Merci à toute l'équipe *Beauveria* : Hugues Télismart et Magali Payet-Hoarau pour leur énorme boulot au laboratoire, et Irénée Promi pour son travail de titan sur le terrain. Merci aussi à Cédric Lallemand, Richard Tibère, Serge Glénac et Jim Payet qui ont prélevé et élevé les insectes martyrisés dans nos manip.

Merci à tous les stagiaires sans qui une grosse partie de ce travail n'aurait pas pu aboutir.

La team mouche : Isabelle Merle, Julie Venard, Damien Verger, sans oublier la touche à tout Manon Verger !

La team ver blanc : Zoé Tourrain, Bastien Zennaro et Guillaume Defrasne.

La team Maldi : Victor Pré et Mayumi Mete.

Merci à tous le personnel du 3P. Merci aux copains doctorants pour leur soutien et amitié.

Merci à mes amis qui ont rendu cette expérience réunionnaise inoubliable, en particulier à Yassi, Kévin et Julien ♥

Merci à ma famille et à Bastien, Σ 'αγαπώ μωρό μου !

Sommaire

Abréviations	1
Synthèse bibliographique	3
I. Les champignons entomopathogènes, agents de lutte biologique.....	3
II. Les <i>Beauveria</i> dans la taxonomie, phylogénie et évolution des champignons entomopathogènes	10
III. Cycle infectieux et interactions hôte-pathogène des Hypocreales	17
IV. Ecologie des champignons entomopathogènes dans leur environnement.....	26
V. Objectifs de la thèse.....	32
Chapitre 1 : Evaluation du spectre d’hôtes physiologique de trois souches de <i>Beauveria</i> spp	35
Article 1 : Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus <i>Beauveria</i>	38
Chapitre 2 : Evaluation de la capacité de transmission horizontale des spores d’une souche de <i>Beauveria bassiana</i> des mâles aux femelles de la mouche du melon lors de l’accouplement	67
Article 2 : Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> in melon flies <i>Zeugodacus cucurbitae</i> during mating	70
Chapitre 3: Diversité génétique des populations de <i>Beauveria hoplocheli</i> et devenir d’une souche commerciale au cours d’une culture dans l’agrosystème canne à sucre à La Réunion	91
Discussion générale	113
I. Elargissement des usages des souches homologuées de <i>B. bassiana</i>	113
II. Lutte contre <i>H. marginalis</i> à La Réunion	117
Références bibliographiques	122

Abréviations

ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
Cirad	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CTICS	Centre technique interprofessionnel de la canne et du sucre de la Réunion
dNTP	Désoxynucléotides triphosphates libres
FDGDON	Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
INRA	Institut National de la Recherche en Agronomie
IRAT	Institut de recherches agronomiques tropicales
ITS	Espaceur interne transcrit ribosomique nucléaire
UMR PVBMT	Unité Mixte de Recherche – Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MCMC	Algorithme de Monte Carlo par chaîne de Markov
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MLG	Génotype multi-locus
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDA	Gélose dextrosée à la pomme de terre
Pr1	Protéase à sérine
SIG	Système d'information géographique
sp.	Espèce
spp.	Espèces
s. l.	Sensu lato
UV	Ultraviolet

Synthèse bibliographique

I. Les champignons entomopathogènes, agents de lutte biologique

Il existe différentes définitions de la lutte biologique et du biocontrôle. Pour le Ministère de l'Agriculture, le biocontrôle consiste en un ensemble de méthodes de protection des végétaux par l'utilisation de mécanismes naturels, qui sont : les substances naturelles biocides, les médiateurs chimiques, les macro-organismes auxiliaires et les micro-organismes (Herth, 2011). Certains auteurs restreignent les termes anglais "biological control" ou "biocontrol" à l'utilisation d'organismes vivants pour réduire la densité ou l'impact d'un bioagresseur sur une culture (Eilenberg *et al.*, 2001). Nous utiliserons pour cette définition en français le terme de lutte biologique.

1. Utilisation des champignons entomopathogènes en lutte biologique

Les champignons entomopathogènes sont utilisés dans les différentes stratégies de lutte biologique : la lutte biologique classique, la lutte biologique par inondation, par inoculation ou par conservation (Eilenberg *et al.*, 2001) (Figure 1).

La lutte biologique classique repose sur l'introduction d'un organisme exotique en vue de son établissement et du contrôle sur le long terme d'un ravageur (Eilenberg *et al.*, 2001). Ces stratégies ont surtout été utilisées pour contrôler un ravageur exotique et invasif grâce à l'introduction d'un ennemi naturel de ce ravageur provenant de sa région d'origine (Hajek & Delalibera, 2010). Un tiers des programmes de lutte biologique classique basés sur des champignons entomopathogènes antérieurs à 2000 ont résulté en un établissement pérenne (Hajek & Delalibera, 2010). Plus de 20 espèces de champignons ont été introduites, l'ordre le plus représenté étant les Hypocreales (Ascomycota) avec au moins 11 espèces et 33 introductions (Hajek *et al.*, 2016). Les champignons de la division des Entomophthoromycota (ordres Entomophthorales et Neozygiales) sont aussi largement utilisés, avec sept espèces et 18 introductions (Hajek *et al.*, 2016). Les champignons appartenant à ces deux ordres sont de bons candidats pour ce type d'approches grâce à leur spectre d'hôtes restreint, leur capacité à

Synthèse bibliographique

causer des épizooties et leurs spores qui survivent longtemps (Pell *et al.*, 2001). Un exemple de lutte biologique classique réussi est l'introduction d'*Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales : Entomophthoraceae) aux Etats-Unis dans les années 1900 pour contrôler *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae), lépidoptère ravageur de nombreuses espèces d'arbres. Ce champignon a causé d'importantes épizooties et s'est bien implanté dans la région infestée par *L. dispar* au Nord-Est des Etats-Unis (Hajek *et al.*, 1996). La connaissance du cycle de vie du champignon et des effets de l'environnement sur sa persistance, sa reproduction et sa germination sont importantes avant de démarrer un programme de lutte biologique classique (Hajek & Delalibera, 2010).

La lutte biologique par inoculation est basée sur le lâcher d'un agent de lutte biologique dans le but qu'il se multiplie et contrôle le ravageur pour une longue période, mais pas de façon permanente (Eilenberg *et al.*, 2001). La lutte biologique par inondation implique l'application d'un organisme en quantité suffisante pour permettre le contrôle immédiat du ravageur, sans attente d'infection secondaire (Eilenberg *et al.*, 2001). Dans ce cas, le champignon entomopathogène est utilisé de manière curative comme un insecticide chimique, et le terme de myco-insecticide est parfois employé. Ces deux approches sont parfois regroupées sous le terme d'augmentation (Shah & Pell, 2003). Environ 170 produits myco-insecticides ont été développés, basés sur au moins 12 espèces de champignons entomopathogènes (Faria & Wraight, 2007). Les champignons anamorphes, à reproduction asexuée, de l'ordre des Hypocreales sont les plus largement utilisés pour ces stratégies, ils sont faciles à produire en masse car ce sont des pathogènes facultatifs qui peuvent être cultivés sur milieu artificiel. Parmi eux, les espèces *Metarhizium anisopliae* s. l. (Metschnikoff) Sorokin et *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin occupent la première place, en entrant à elles deux dans la composition d'environ deux tiers des produits (Faria & Wraight, 2007). Les entomopathogènes de l'ordre des Entomophthorales sont plus difficiles à cultiver car ce sont des pathogènes obligatoires, ils sont donc essentiellement utilisés dans des programmes de lutte biologique classique ou par conservation (Shah & Pell, 2003). Un exemple de lutte inondative est l'utilisation de *Metarhizium acridum* pour lutter contre les criquets en Afrique, dans le produit Green Muscle (Lomer *et al.*, 2001). *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch est utilisé dans le cadre d'une lutte par inoculation pour contrôler le hanneton *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) en Europe (Enkerli *et al.*, 2004; Keller, 2000). La lutte contre *H. marginalis* à La Réunion avec *B. hoplocheli* Robène-Soustrade & Nibouche est mise en œuvre comme une lutte biologique par inoculation. Le traitement est appliqué au

Synthèse bibliographique

moment de la plantation de la canne à sucre, en vue d'un contrôle du ravageur sur plusieurs années, puis il est appliqué de nouveau à chaque replantation, tous les sept ans en moyenne.

La lutte biologique par conservation n'introduit pas de nouvel organisme mais implique des modifications des pratiques agronomiques et de l'environnement pour protéger et augmenter la prévalence d'un ennemi naturel afin de réduire l'impact du ravageur (Eilenberg *et al.*, 2001). Cette stratégie nécessite une connaissance approfondie de l'écologie de l'espèce concernée, aussi bien à l'échelle de l'individu qu'à celle de la communauté. Les pratiques agronomiques pouvant favoriser le développement de champignons entomopathogènes comprennent l'irrigation pour augmenter l'humidité, la réduction de l'application de pesticides, la modification des pratiques de labour ou encore l'aménagement d'habitats semi-naturels pour abriter des hôtes alternatifs (Pell *et al.*, 2010). Par exemple, il a été montré que le puceron *Microlophium carnosum* Buckton (Homoptera: Aphididae), qui n'est pas un ravageur des cultures, peut servir de réservoir de l'entomopathogène *Pandora neoaphidis* Humber (Entomophthorales : Entomophthoraceae) en vue de contaminer des pucerons ravageurs tels que *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Ekesi *et al.*, 2005). Le fait de planter des haies constituées de plusieurs espèces en bordure de champs favorise la biodiversité et pourrait abriter *P. neoaphidis* si elles contiennent des plantes hôtes de pucerons sensibles à ce champignon (Pell *et al.*, 2010).

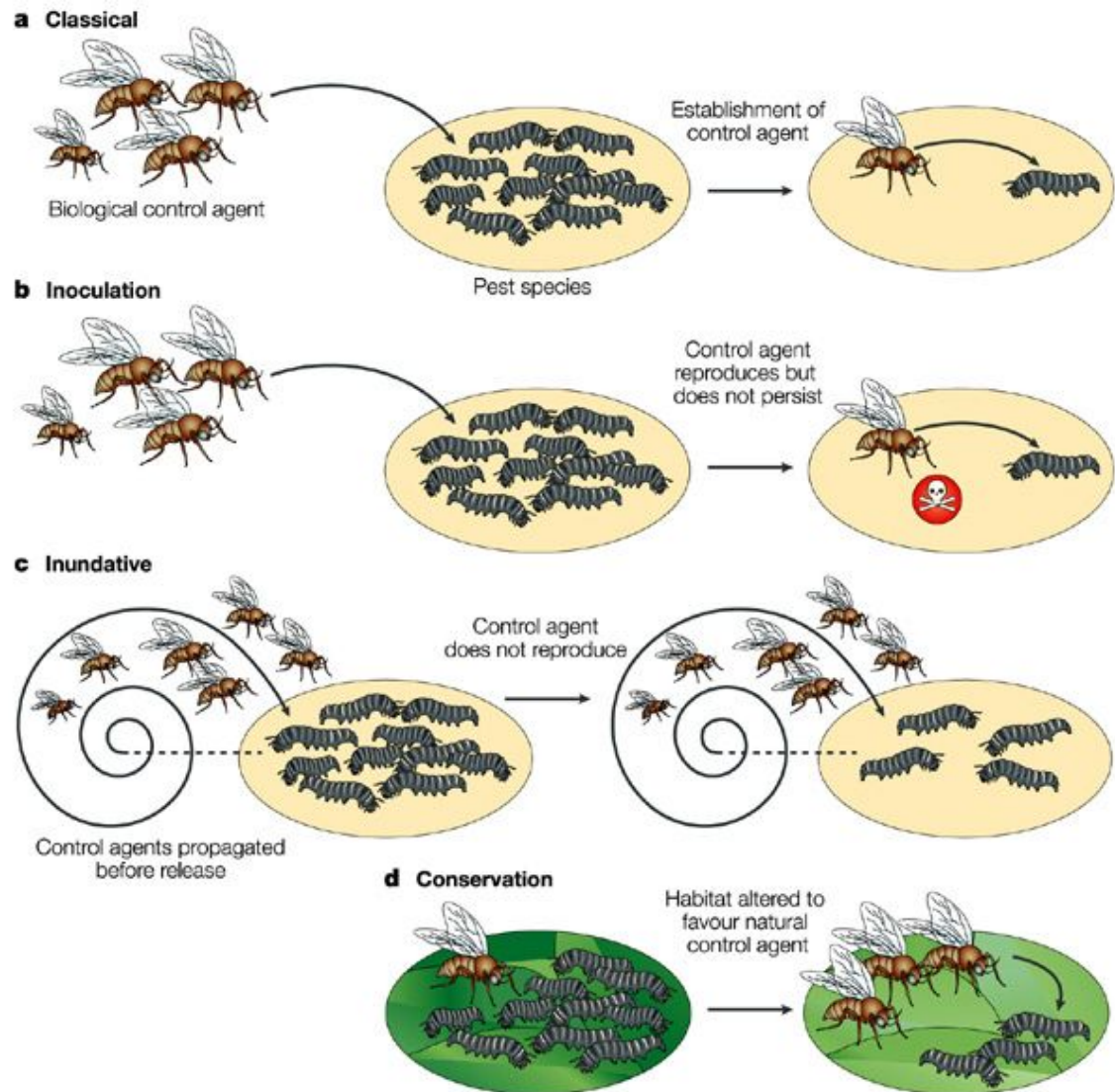


Figure 1 : Les quatre types de lutte biologique (Roderick & Navajas, 2003)

2. Utilisation commerciale des champignons du genre *Beauveria*

Les *Beauveria* spp. font partie des champignons les plus exploités en lutte biologique, avec le genre *Metarhizium*. Cela s'explique par leur répartition cosmopolite, leur large spectre d'hôte et leur facilité à être produits en grande quantité.

L'espèce *B. bassiana* représente à elle seule 33,9 % des 171 myco-insecticides recensés en 2007, quand *B. brongniartii* est présente dans 4,1 % des produits (Faria & Wraight, 2007). *Beauveria bassiana* est utilisé dans le monde pour lutter contre des ravageurs appartenant à neuf ordres et au moins 38 familles d'insectes ainsi que trois familles d'acariens (Faria &

Synthèse bibliographique

Wraight, 2007). En Europe, aux Etats-Unis, au Mexique et au Japon, la souche GHA est largement utilisée contre des hémiptères comme les aleurodes, les pucerons, les psylles, les cicadelles et les cochenilles ; des coléoptères dans les familles Curculionidae, Scarabaeidae et Chrysomelidae ; les thrips ; des orthoptères comme les criquets (Faria & Wraight, 2007; Mascarin & Jaronski, 2016). Au Brésil, une autre souche est utilisée contre les ravageurs du café et des eucalyptus, comme l'aleurode *Bemisia tabaci* Gennadius ou le scolyte du caféier *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera : Curculionidae). Deux autres souches de *B. bassiana* ont récemment été homologuées en Europe par l'entreprise Arysta Lifescience. La souche I-2960 est utilisée pour lutter contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) et contre les ravageurs des palmiers, notamment le papillon *Paysandisia archon* Burmeister (Lepidoptera: Castniidae) (Besse *et al.*, 2008). La souche I-2961 a été homologuée pour un usage contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera : Curculionidae) et contre le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera : Dryophthoridae) (Besse *et al.*, 2013).

Beauveria brongniartii est principalement utilisée pour lutter contre des coléoptères de la famille des Scarabaeidae en Europe (Faria & Wraight, 2007). Cette espèce est par exemple commercialisée en Suisse pour un usage contre le hanneton *M. melolontha* (Enkerli *et al.*, 2004).

L'espèce *B. hoplocheli* est utilisée uniquement à La Réunion dans le produit Betel contre *H. marginalis* en culture de canne à sucre (Robène-Soustrade *et al.*, 2015).

3. Production et formulation

La production et la formulation sont critiques dans le développement d'un agent de lutte biologique fongique, en particulier si celui-ci est utilisé en contrôle par inondation, ou inoculation. Le champignon doit dans ce cas être produit en masse, de façon rentable et avoir une bonne conservation. La méthode la plus utilisée pour les myco-insecticides à base de *Beauveria* et *Metarhizium* est la production de conidies (spores asexuées) aériennes sur un substrat solide (Bartlett & Jaronski 1988; Faria & Wraight 2007). Il est également possible de produire des conidies de *B. bassiana* sous des conditions particulières de fermentation liquide (Thomas *et al.*, 1987). Ces conidies « immergées » sont morphologiquement différentes des conidies aériennes, au niveau de leur paroi, et elles peuvent être produites plus rapidement. En conditions liquides, certains Hypocreales produisent des blastospores. Ces structures qui ressemblent à des levures sont produites lors de l'infection d'un insecte et colonisent

Synthèse bibliographique

l'hémocœle (Inglis *et al.*, 2001). Des formulations commerciales à base de blastospores sont disponibles, par exemple pour le champignon *Cordyceps fumosorosea* (= *Isaria fumosorosea*) contre les aleurodes (Faria & Wraight, 2007). Ces blastospores germent très rapidement, ce qui est un avantage pour l'utilisation comme insecticides de contact (Jackson *et al.*, 2003).

Concernant les formulations, près de 26% des produits disponibles sont des substrats colonisés par le champignon, 20% sont des poudres mouillables et 15% des suspensions dans une huile (Faria & Wraight, 2007). Les formulations de myco-insecticides ont pour rôle d'améliorer la stabilité et l'efficacité de l'agent entomopathogène. Par exemple, les suspensions dans l'huile peuvent allonger la durée de vie du produit, protéger le champignon des rayons UV (Behle *et al.*, 2009), des hautes températures (de Oliveira *et al.*, 2018) ou encore des fongicides (Lopes *et al.*, 2011b). Certains adjuvants peuvent aussi améliorer l'adhérence des conidies sur l'insecte (Barton *et al.*, 2006).

Le choix d'une formulation doit prendre en compte l'environnement et l'écologie de l'insecte cible (Jackson *et al.*, 2010). Pour lutter contre les insectes du sol, une formulation sur granulés pourra être développée pour favoriser la persistance du champignon et son relargage progressif. Une formulation liquide pulvérisable sera plutôt utilisée en cas de traitement par contact direct sur des insectes aériens, dans les serres par exemple. Dans ce cas, il faudra produire un grand nombre de conidies ou blastospores, et la formulation pourra inclure une photoprotection.

4. Méthodes d'application

Les Hypocreales entomopathogènes sont traditionnellement utilisés dans des stratégies de contrôle par inondation, comme des insecticides chimiques. Les traitements nécessitent donc des grandes quantités de propagules, en général des conidies aériennes, qui sont appliquées directement sur l'insecte cible et son environnement (Mascarin & Jaronski, 2016). Des applications par pulvérisation sont utilisées contre les insectes aériens et les granulés sont privilégiés pour les insectes qui vivent dans le sol. Les résultats obtenus avec de telles approches peuvent être décevants comparés aux insecticides chimiques. De plus, certains ravageurs occupent des habitats difficilement accessibles par pulvérisation, comme l'intérieur des tiges, des fruits ou des bourgeons, la face inférieure des feuilles ou des habitats souterrains. De nouvelles techniques d'application sont développées pour pallier ces difficultés, augmenter la précision et la spécificité du traitement et réduire les doses d'inoculum, ce qui permet de diminuer les coûts et les risques d'effets indésirables sur des

Synthèse bibliographique

espèces non-cibles. Par exemple Hajek *et al.* (2006) ont développé une stratégie qui consiste à placer sur le chemin des coléoptères *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), ravageurs des feuillus, des bandes imprégnées de conidies d'entomopathogènes autour des troncs d'arbres, afin que les insectes se contaminent d'eux-mêmes avant de se reproduire. Une autre approche originale appelée l'entomovection consiste à utiliser des insectes pollinisateurs pour apporter l'agent pathogène directement sur les plantes hôtes de l'insecte (Mommaerts & Smaghe, 2011). Cette méthode implique de concevoir des systèmes de distribution placés à la sortie des ruches, qui déposent sur l'insecte vecteur une formulation adaptée du champignon. Des essais menés avec des abeilles (*Apis mellifera* L.) et des bourdons (*Bombus* spp.) (Hymenoptera : Apidae) comme vecteurs ont montré que les champignons *B. bassiana* et *M. anisopliae* s. l. n'avaient pas d'effet négatif sur leur longévité (Kapongo *et al.*, 2008; Shipp *et al.*, 2012), même si des risques existent (Hokkanen *et al.*, 2003). Cette technique a été testée contre des ravageurs du colza (Al-mazra'awi *et al.*, 2006a; Butt *et al.*, 1998) et dans les serres contre des thrips, aleurodes et pucerons (Al-mazra'awi *et al.*, 2006b; Kapongo *et al.*, 2008).

Une autre stratégie largement étudiée consiste à manipuler le comportement de l'insecte cible pour l'attirer vers un dispositif d'auto-inoculation contenant le champignon entomopathogène, depuis lequel l'insecte pourra aller disséminer le pathogène parmi la population. On appelle cette stratégie l'auto-dissémination (Vega *et al.*, 2007). Elle a plusieurs avantages : la quantité d'inoculum requise est réduite, ce qui réduit les coûts et l'impact environnemental ; l'utilisation d'attractifs spécifiques à l'insecte cible, comme des phéromones sexuelles, permet de réduire les risques d'effets sur les insectes non-cibles ; le champignon est protégé des aléas climatiques, et notamment des rayons UV, dans le dispositif d'auto-inoculation. Cette stratégie d'auto-dissémination a été développée et testée pour un certain nombre d'insectes ravageurs ou vecteurs de maladie, en utilisant principalement des spores de *B. bassiana* ou de *M. anisopliae* s. l. On peut citer par exemple chez les diptères, la mouche domestique *Musca domestica* L. (Renn *et al.*, 1999), plusieurs espèces de mouches des fruits de la famille des Tephritidae (Navarro-Llopis *et al.*, 2015; Thaochan & Ngampongsai, 2015), les mouches tsé-tsé *Glossina* spp. (Maniania, 2002) ; chez les coléoptères *H. hampei* (Mota *et al.*, 2017), le scarabée japonais *Popillia japonica* Newman (Klein & Lacey, 1999) et le charançon du bananier *C. sordidus* (Lopes *et al.*, 2014b) ; chez les hémiptères le psylle *Diaphorina citri* Kuwayama (Avery *et al.*, 2009) ; chez les lépidoptères la teigne des fruits secs *Plodia interpunctella* (Hübner) (Baxter *et al.*, 2008) et la teigne des crucifères *Plutella xylostella* L. avec *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) (Furlong *et al.*, 1995). Il y a en

revanche peu de démonstrations de l'efficacité de la méthode en conditions réelles pour le contrôle durable de la cible. Lors du développement d'une stratégie d'auto-dissémination, il est important de vérifier que la transmission horizontale, c'est-à-dire entre individus de l'espèce cible, est un bon moyen de disséminer le champignon (Baker *et al.*, 2017; Kreutz *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2011a; Quesada-Moraga *et al.*, 2008).

II. Les *Beauveria* dans la taxonomie, phylogénie et évolution des champignons entomopathogènes

1. Evolution et classification des champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes sont des microorganismes capables d'utiliser des arthropodes vivants comme principale source de nutriments. La pathogénicité envers les insectes est un exemple d'évolution convergente, elle est apparue indépendamment à plusieurs reprises dans plusieurs lignées évolutives de champignons (Humber, 2008). La plus ancienne preuve d'infection d'un insecte par un champignon provient d'un fossile préservé dans l'ambre, daté du Crétacé inférieur (100-140 millions d'années) (Sung *et al.*, 2008). Il s'agit d'une cochenille parasitée par un champignon de type *Ophiocordyceps*. Plus de mille espèces actuelles de champignons sont connues comme pathogènes pour les insectes (étant capables d'infecter et de tuer des insectes), réparties dans une centaine de genres (Roberts & Humber, 1981). On retrouve des champignons entomopathogènes dans cinq embranchements du règne des Mycota : Blastocladiomycota, Microsporidia, Basidiomycota, Ascomycota, et Entomophthoromycota. Les entomopathogènes sont les plus représentés dans trois groupes majeurs : le sous-embranchement des Entomophthoromycotina et deux ordres d'Ascomycota, les Hypocreales et les Onygenales (genre *Ascosphaera*) (Boomsma *et al.*, 2014).

La classification des champignons a longtemps été basée sur des critères morphologiques. Depuis le développement des outils moléculaires, cette classification a beaucoup évolué. Par exemple, on classait auparavant avant les formes asexuées, anamorphes, dans un groupe séparé, les Deutéromycètes. Ces formes ont depuis pu être associées à des espèces sexuées, notamment au sein des Ascomycètes, tout en conservant les deux noms. A la suite de la décision prise au XVIIIe Congrès international de botanique de Melbourne en 2011, le système de double nomenclature a été abandonné, au profit de la règle "One fungus = One name" (un champignon = un nom) (Hawksworth, 2011).

Synthèse bibliographique

Les méthodes moléculaires permettent d'étudier les relations phylogénétiques et de définir les espèces de champignons non distinguables morphologiquement. Ces méthodes reposent sur la comparaison de séquences d'ADN. La séquence de l'espaceur interne transcrit (ITS), une région de l'ADN ribosomique nucléaire, est l'une des séquences les plus utilisées pour l'identification et la taxonomie moléculaire des champignons. Elle est employée comme code-barre universel (Schoch *et al.*, 2012). La région ITS possède de nombreux avantages, parmi lesquels on peut citer sa grande variabilité au niveau interspécifique et faible variabilité au niveau intraspécifique, la facilité à l'amplifier chez tous les champignons avec des amorces universelles ainsi que les importantes bases de données disponibles (Kõljalg *et al.*, 2013; Nilsson *et al.*, 2012; Schoch *et al.*, 2012). En revanche, l'utilisation de la région ITS comme seul marqueur n'est pas toujours suffisante pour établir les relations phylogénétiques et pour séparer des espèces très proches (Dupuis *et al.*, 2012; Rehner & Buckley, 2005). Les études phylogénétiques les plus récentes se basent sur la combinaison de séquences de plusieurs zones du génome, comme celles de l'ITS, de la région intergénique Bloc, ainsi que des gènes codant pour la petite et la grande sous-unité de l'ARNr, le facteur d'élongation 1-alpha (*EF1- α*) et les sous-unités *RPB1* et *RPB2* de l'ARN polymérase II (Hibbett *et al.*, 2007; Rehner *et al.*, 2011; Sung *et al.*, 2007).

2. Entomopathogénicité dans l'ordre des Hypocreales

L'ordre des Hypocreales est celui qui contient le plus grand nombre et la plus grande diversité d'espèces pathogènes des arthropodes (Humber, 2008). Parmi les huit familles qui le composent, trois regroupent la grande majorité des espèces entomopathogènes : les familles des Clavicipitaceae, des Cordycipitaceae et des Ophiocordycipitaceae (Spatafora *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2007). Ces trois familles ont été décrites par Sung *et al.* (2007), dont l'étude de phylogénie moléculaire a aussi montré la polyphylie du genre *Cordyceps*. La famille des Clavicipitaceae contient principalement des espèces phytopathogènes, mais aussi un genre entomopathogène d'importance majeure en lutte biologique, *Metarhizium* (Kepler *et al.*, 2014; Spatafora *et al.*, 2007). La famille des Cordycipitaceae regroupe surtout des espèces et genres pathogènes des insectes, dont *Cordyceps* Fr. (syn. *Isaria* Pers.), *Beauveria* et *Akanthomyces* Lebert (syn. *Lecanicillium* W. Gams & Zare) qui sont largement utilisés en lutte biologique (Kepler *et al.*, 2017). La famille des Ophiocordycipitaceae contient de nombreuses espèces entomopathogènes, en particulier dans les genres *Ophiocordyceps* Petch et *Purpureocillium* Luangsa-ard *et al.* (Quandt *et al.*, 2014). L'espèce la plus connue et la plus étudiée de cette famille est *O. sinensis*, en raison de son importance économique, médicinale et culturelle en

Synthèse bibliographique

Asie (Shrestha *et al.*, 2010). Il apparaît que les entomopathogènes ne forment pas un groupe monophylétique au sein des Hypocreales et que de multiples sauts d'hôtes inter-règnes (champignons-plantes-animaux) ont eu lieu au cours de l'évolution (Spatafora *et al.*, 2007) (**Figure 2**).

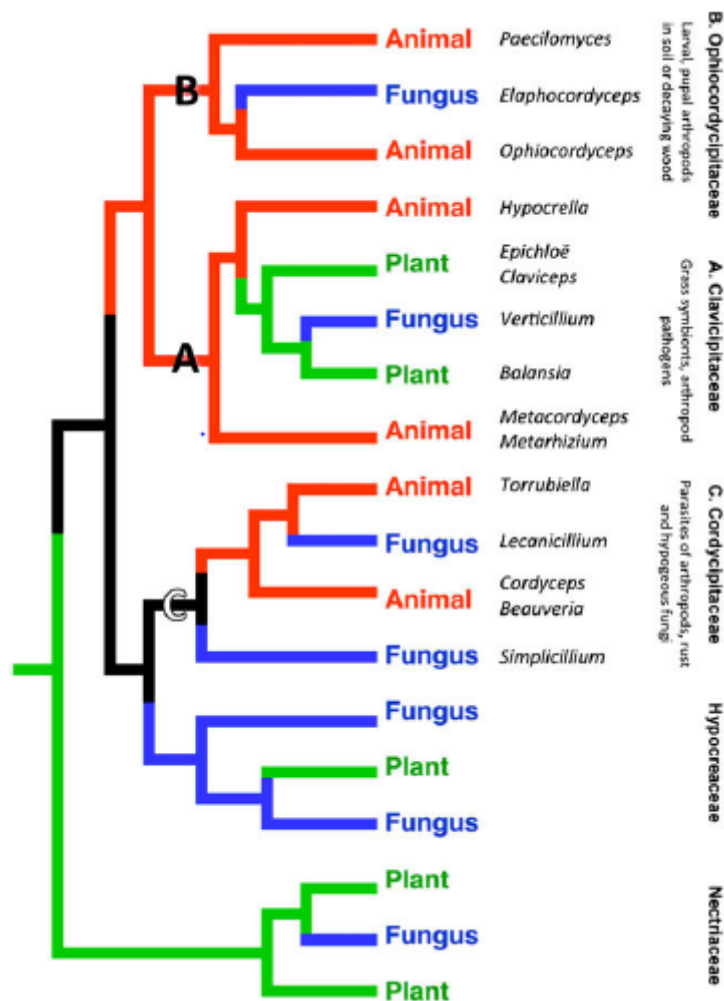


Figure 2 : Arbre phylogénétique des Hypocreales montrant les sauts d'hôtes inter-règnes. La couleur des branches correspond à la reconstruction de l'état ancestral du caractère association d'hôte. Noir : ambigu ; bleu : champignon ; vert : plante ; rouge : animal (Vega *et al.*, 2009 ; d'après Spatafora *et al.*, 2007).

3. Le genre *Beauveria*

Beauveria est l'un des genres les plus connus de champignons entomopathogènes, en raison de son utilisation de longue date comme agent de lutte biologique ainsi que de son rôle dans le développement de la théorie microbienne. En 1834, Agostino Bassi fut le premier à démontrer qu'une maladie, la muscardine blanche des vers à soie, était causée par un agent vivant pathogène (Porter, 1973). Cet agent fut par la suite décrit comme l'espèce type du

Synthèse bibliographique

genre *Beauveria*. L'espèce fut nommée dans un premier temps *Botrytis bassiana* par Balsamo-Crivelli en 1835 en l'honneur de Bassi (Rehner & Buckley, 2005). Le genre *Beauveria* fut formellement décrit par Vuillemin (Vuillemin, 1912) à la suite des travaux de Beauverie.

Beauveria fut longtemps considéré comme un genre exclusivement constitué d'espèces anamorphes, sans cycle sexué connu. Ce genre était placé dans la division des Deuteromycètes, ou champignons imparfaits. Le développement d'outils moléculaires a permis de relier les espèces *B. bassiana*, *B. brongniartii* et *B. sungii* à des formes sexuées, ou téléomorphes, du genre *Cordyceps* (Li *et al.*, 2001; Shimazu *et al.*, 1988; Shrestha *et al.*, 2014). Des analyses phylogénétiques ont confirmé la monophylie du genre *Beauveria* et sa classification dans l'ordre des Hypocreales et la famille des Cordycipitaceae (Rehner & Buckley, 2005; Rehner *et al.*, 2011; Sung *et al.*, 2007). Les formes téléomorphes n'ont été que très rarement observées, majoritairement en Asie, et les populations de *Beauveria* sont généralement clonales (Bidochka *et al.*, 2002).

Les anamorphes du genre *Beauveria* sont caractérisés morphologiquement par un mycélium septé hyalin qui se ramifie en conidiophores hyalins portant des cellules conidiogènes globuleuses ou en forme de bouteille. Ces cellules conidiogènes se prolongent pour produire une structure en zig-zag appelée rachis sur laquelle se développent des conidies en succession sympodiale. La description des espèces de *Beauveria* a longtemps été basée uniquement sur des traits morphologiques, en particulier sur la taille et la forme des conidies. Elles sont hyalines, ont des parois lisses, une taille variable (1,5 à 5,5µm) et des formes variables, globulaire, réniforme ou encore cylindrique (Rehner *et al.*, 2011). Les formes téléomorphes de *Beauveria* (= *Cordyceps*) sont très différentes morphologiquement des anamorphes. Elles produisent des structures reproductives particulières appelées stromas, de couleur jaune-orangée, qui contiennent les périthèces dans lesquels les asques sont formés (Sung *et al.*, 2006). Les asques renferment les spores sexuées, ou ascospores.

En 2005, une analyse phylogénétique a été réalisée par Rehner et Buckley sur 86 isolats de *Beauveria* spp. présentant une diversité importante en termes d'habitats, d'origines géographiques et d'hôtes, en combinant les séquences d'ITS et d'*EF1-α*. Cette étude a montré que certaines espèces de *Beauveria* définies morphologiquement étaient en réalité constituées d'espèces cryptiques, ne différant pas morphologiquement mais éloignées phylogénétiquement (Rehner & Buckley, 2005). Les auteurs ont pu définir cinq espèces et prouver la non-monophylie de l'espèce désignée alors comme *B. bassiana* (Rehner & Buckley, 2005). La séquence de la région intergénique Bloc a ensuite été spécifiquement

Synthèse bibliographique

utilisée pour étudier plus finement les relations phylogénétiques dans le genre *Beauveria*, en particulier au sein du complexe d'espèces *B. bassiana* s. l. (Rehner *et al.*, 2006). En 2011, une étude multigénique combinant les séquences de la région intergénique Bloc et des gènes *EF1- α* , *RPB1* et *RPB2*, a établi 12 espèces de *Beauveria*, en séparant notamment *B. bassiana* et *B. pseudobassiana* (Rehner *et al.*, 2011). Cinq autres espèces ont été décrites de 2011 à 2016 (Agrawal *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013; Imoulan *et al.*, 2016; Robène-Soustrade *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Il a notamment été montré que les souches de *Beauveria* isolées sur *Hoplochelus marginalis* (Fairmaire) (Coleoptera : Melolonthidae) à La Réunion et à Madagascar n'appartenaient pas à l'espèce *B. brongniartii* comme considéré jusqu'alors, mais à une nouvelle espèce appelée *B. hoplocheli* (Robène-Soustrade *et al.*, 2015) (Figure 3). Pour se conformer à la nouvelle règle "One fungus = One name", le genre *Beauveria* a été formellement séparé du genre *Cordyceps* et les téléomorphes ont pris le nom de *Beauveria* (Kepler *et al.*, 2017). Pour certaines espèces, les deux formes sont connues, anamorphe et téléomorphe. C'est le cas par exemple de *B. bassiana* et *B. brongniartii* (Li *et al.*, 2001; Shimazu *et al.*, 1988). Pour d'autres, seule la forme anamorphe a été observée, comme c'est le cas pour *B. hoplocheli* (Robène-Soustrade *et al.*, 2015). La forme téléomorphe est à ce jour la seule décrite pour certaines espèces, comme *B. blattidicola* (Kepler *et al.*, 2017).

Synthèse bibliographique

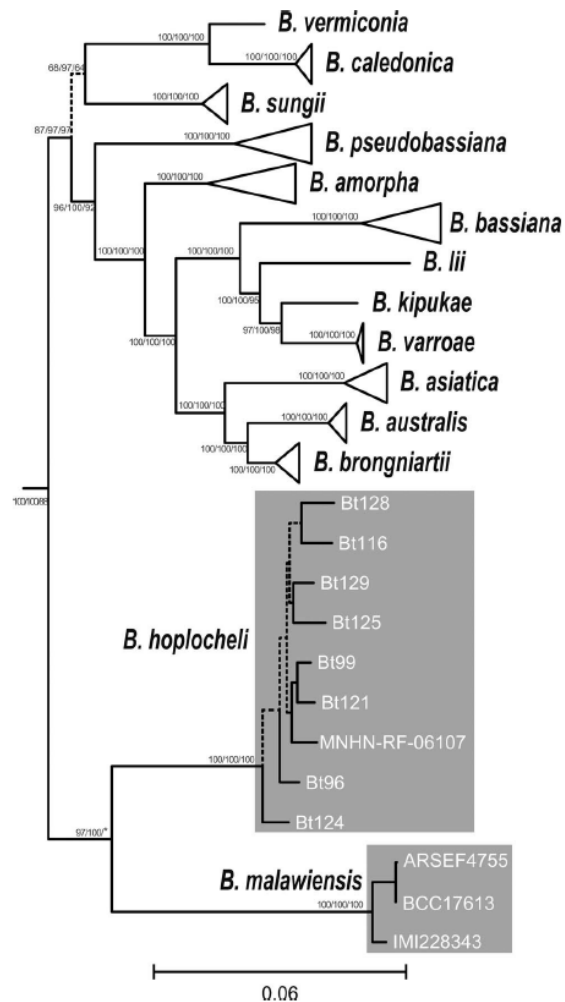


Figure 3 : Arbre phylogénétique de 14 espèces du genre *Beauveria*, montrant la position des souches de *B. hoplocheli* isolées d'*Hoplochelus marginalis* (Robène-Soustrade et al., 2015).

Le génome de *B. bassiana* a été séquencé (Xiao *et al.*, 2012), ainsi que ceux d'autres Hypocreales entomopathogènes comme *Cordyceps militaris* (Zheng *et al.*, 2011), *M. robertsii* et *M. acridum* (Gao *et al.*, 2011), *M. anisopliae* (Pattimore *et al.*, 2014) et d'autres *Metarhizium* (Hu *et al.*, 2014). L'étude de ces génomes permet de mieux comprendre les mécanismes et l'évolution de la pathogénicité chez ces champignons. La taille du génome de *B. bassiana* est de 33,7 Mb et il contiendrait 10 366 gènes. Il a plus de similarité avec le génome de *Cordyceps militaris* qu'avec celui de *M. robertsii*. Les quatre ascomycètes entomopathogènes dont le génome est séquencé ont une proportion de leur génome dédiée aux protéines sécrétées de deux à trois fois plus importante que les autres ascomycètes, y compris les phytopathogènes (Xiao *et al.*, 2012).

4. Biologie des *Beauveria* spp.

La **Figure 4** résume ce que l'on connaît du cycle biologique des champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales, dont les *Beauveria* spp. (Boomsma *et al.*, 2014). Les conidies haploïdes produites sur le corps de l'insecte hôte après sa mort (1) sont disséminées passivement dans l'environnement pour infecter de nouveaux hôtes (Bonito *et al.*, 2014). Rarement, des structures de reproduction sexuée, les stromas, sont produites sur un hôte (3). Elles produisent des ascospores après méiose, qui vont infecter d'autres hôtes (4). Les conidies de certaines espèces sont capables d'infecter des tissus végétaux (5) et de coloniser une plante pour s'établir comme endophyte (6). Les conidies présentes dans le sol peuvent coloniser les racines des plantes (7) et se maintenir dans la rhizosphère (8). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer si les propagules fongiques produites dans la rhizosphère ou dans les tissus végétaux peuvent infecter les insectes phytophages (9) (10).

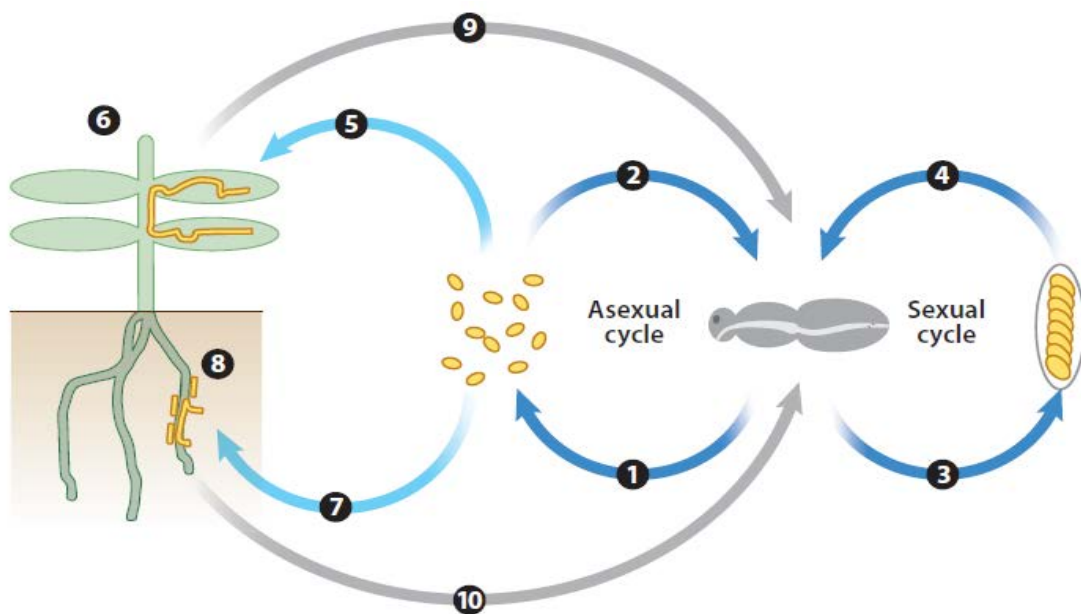


Figure 4 : Cycle biologique général des Hypocreales (Boomsma *et al.*, 2014).

III. Cycle infectieux et interactions hôte-pathogène des Hypocreales

Dans ce manuscrit, nous utiliserons les définitions les plus communément admises dans le domaine de la pathologie des invertébrés pour les termes de pathogénicité et de virulence (Onstad *et al.*, 2006; Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). La pathogénicité d'un organisme est définie comme sa capacité à causer une pathologie à un hôte. La virulence correspond quant à elle à l'intensité de la pathologie causée, c'est une notion quantitative qui peut être mesurée.

1. Mécanismes de l'infection

Les mécanismes moléculaires en jeu lors de l'infection ont été largement étudiés chez *Beauveria bassiana* et *Metarhizium* spp., qui sont les organismes modèles pour l'étude du processus d'infection des champignons entomopathogènes (Butt *et al.*, 2016). Les champignons entomopathogènes se distinguent des autres agents pathogènes des insectes car ils sont capables d'infecter leur hôte en traversant la cuticule, sans avoir besoin d'être ingérés (Clarkson & Charnley, 1996). L'infection peut être initiée à n'importe quel endroit sur la cuticule de l'hôte, même si des sites préférentiels d'infection ont été observés pour de nombreux insectes, là où la cuticule est moins sclérotisée (appendices buccaux, anus). L'infection par un champignon entomopathogène fait intervenir des étapes successives qui conduisent à la mort de l'insecte : l'adhésion des conidies à la cuticule, la germination, la différenciation des structures infectieuses, la pénétration, la colonisation de l'hémocœle par des blastospores et la sporulation sur le cadavre mycosé (Figure 5).

Synthèse bibliographique

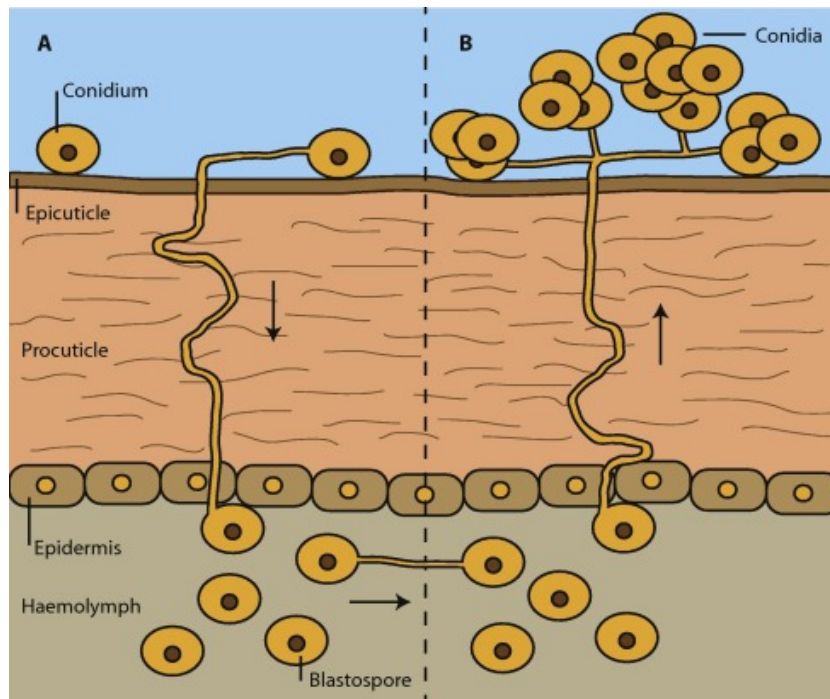


Figure 5 : Cycle infectieux de *Beauveria bassiana* chez l'insecte. Les flèches indiquent la direction de la croissance du champignon (Valero-Jiménez et al., 2016).

a. Adhésion

La cuticule des insectes constitue la première et principale barrière à l'infection. Elle est constituée de plusieurs couches qui ont des compositions différentes. En simplifiant, on peut distinguer l'épicuticule, composée de cuticuline (lipoprotéines tannées) et recouverte d'une couche lipidique imperméable riche en hydrocarbures, acides gras et cérides. La procuticule est principalement constituée de chitine et de protéines sclérotisées (Andersen, 1979).

L'adhésion des conidies de *Beauveria bassiana* sur la cuticule des insectes est contrôlée par la transcription de gènes spécifiques et par des interactions non-spécifiques, principalement des forces hydrophobes et électrostatiques (Boucias & Pendland, 1991). Les conidies de *B. bassiana* et *Metarhizium* spp. sont recouvertes d'une couche à bâtonnets constituée d'hydrophobines, des protéines qui contribuent à rendre les spores hydrophobes. Ceci facilite leur adhésion passive par liaisons hydrophobes à la couche lipidique externe de l'épicuticule (Pedrini *et al.*, 2007). Chez *B. bassiana*, deux hydrophobines, Hyd1 et Hyd2, ont été caractérisées (Zhang *et al.*, 2011). Les deux protéines jouent un rôle dans l'adhésion des conidies, mais seule l'absence de Hyd1 provoque une diminution de la virulence. La forte adhésion des conidies à la cuticule est également permise par la sécrétion d'un mucilage qui interagit avec les protéines du tégument de l'insecte (Boucias & Pendland, 1991). L'adhésine MAD1 facilite l'adhésion de *M. anisopliae* s.s. à la cuticule des arthropodes, et est liée à sa

Synthèse bibliographique

virulence, alors que MAD2 lui permet d'adhérer aux plantes (Gao *et al.*, 2011; Wang & St Leger, 2007).

Les interactions à la surface de la cuticule peuvent influencer la capacité du pathogène à infecter un hôte. Par exemple, les conidies de *M. anisopliae* n'adhèrent pas fermement à la cuticule des larves aquatiques du moustique *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae), les forces d'adhésion étant beaucoup plus faibles qu'avec la cuticule d'insectes terrestres (Greenfield *et al.*, 2014). Une hypothèse expliquant ce phénomène pourrait être l'absence d'hydrocarbures à longues chaînes, qui sont une source de nutriments nécessaire à la germination et donc à l'adhésion ferme des conidies sur la cuticule (Greenfield *et al.*, 2014).

b. Germination et différenciation

La germination des conidies dépend des conditions environnementales, notamment la température et l'humidité (Butt *et al.*, 1995). Une source de carbone est nécessaire pour la germination des conidies, ainsi qu'une source d'azote pour la croissance des structures infectieuses (Smith & Grula, 1981). Le champignon est capable d'hydrolyser la chitine, certains acides gras, des hydrocarbures cuticulaires ou encore différents lipides cuticulaires (Pedrini *et al.*, 2007).

La germination aboutit, chez *Metarhizium* spp. et chez certaines souches de *B. bassiana*, à la formation d'un appressorium, une structure spécifique à l'infection. Cet appressorium évolue ensuite en hyphes, qui pénètrent la cuticule (St. Leger *et al.*, 1989).

c. Pénétration

La pénétration des hyphes fongiques à travers la cuticule est rendue possible par la production d'une diversité d'enzymes, parmi lesquelles des protéases, des estérases, des chitinases, des lipases et des N-acétylglucosaminidases (St. Leger, 1993). La quantité et la diversité des gènes codant pour des protéases et des chitinases présents dans le génome des champignons entomopathogènes soulignent l'importance de ces enzymes dans le processus d'infection (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Des analyses transcriptomiques ont montré que *Metarhizium* spp. exprime un large spectre de protéases au moment de la pénétration (Gao *et al.*, 2011), tout comme *B. bassiana* (Xiao *et al.*, 2012). Chez *M. anisopliae*, les deux principales protéases sont Pr1, une chymoélastase, et Pr2, une trypsine (St. Leger *et al.*, 1987). Pr1 est sécrétée en grande quantité pendant la pénétration, par les appressoria en surface de la cuticule et par les hyphes qui pénètrent la cuticule. Pr1 est d'abord localisée à proximité immédiate des structures fongiques, puis la protéase diffuse à travers la cuticule

Synthèse bibliographique

pendant l'infection (Goettel *et al.*, 1989). C'est un facteur de virulence important chez *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1988) et chez *B. bassiana* (Bidochka & Khachatourians, 1990).

d. Colonisation et dissémination

Une fois que le champignon a atteint l'hémocoel, il se multiplie sous forme de structures levuriformes, les blastospores. Les champignons du genre *Metarhizium* produisent une protéine de type collagène, Mc11, qui forme une couche protectrice autour des cellules fongiques pour empêcher leur encapsulation ou phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte (Wang & Leger, 2006). *Beauveria* et *Metarhizium* produisent également des métabolites secondaires toxiques pour l'insecte, tels que la beauvericine (Wang & Xu, 2012), l'oosporéine (Strasser *et al.*, 2000) et les destruxines (Kershaw *et al.*, 1999), qui affaiblissent la réponse immunitaire de l'hôte et permettent aux blastospores de proliférer dans l'hémolymphe. L'infection par le champignon entraîne la mort de l'insecte en quelques jours par une combinaison de déplétion de nutriments et de toxicose. Des hyphes fongiques colonisent entièrement le corps de l'hôte, le déshydratent et le momifient, puis ils émergent de l'insecte et produisent des conidies à la surface. Les conidies des Hypocreales sont disséminées passivement, principalement sous l'action du vent et de la pluie. Leur contact avec de nouveaux hôtes potentiels dépend notamment de leur présence dans le sol ou sur la surface des feuilles, où les insectes recherchent de la nourriture. Les formes téléomorphes des Hypocreales produisent sur l'insecte des stromas contenant des asques qui renferment des spores sexuées. La production de ces spores nécessite, chez les espèces hétérothalliques, une infection par des mycéliums de mating-types (ou polarité) différents (Boomsma *et al.*, 2014). Les téléomorphes de type *Cordyceps* produisent des stromas très remarquables, de couleur jaune-orangée (Sung *et al.*, 2006).

2. Réponse immunitaire de l'hôte à l'infection

Au cours de leur évolution, les insectes ont développé différents mécanismes de défense pour éviter l'infection par des micro-organismes pathogènes. La mouche des fruits *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae) est l'organisme modèle pour l'étude de l'immunité innée des insectes et des interactions hôte-pathogène (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Les défenses immunitaires de *D. melanogaster* sont basées sur deux mécanismes principaux : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. L'immunité cellulaire est une réponse rapide à

Synthèse bibliographique

l'infection, elle repose sur des cellules sanguines, les hémocytes, présentes dans l'hémocoel de l'insecte. Il existe trois types d'hémocytes chez *Drosophila* : les plasmatocytes jouent le rôle de phagocytes, les cellules à cristaux sont impliquées dans les réactions de mélanisation (dépôt de mélanine sur les cellules pathogènes pour les immobiliser et les tuer) et les lamellocytes permettent les réactions d'encapsulation des micro-organismes pathogènes (Evans & Banerjee, 2003). L'immunité humorale correspond à une réponse plus tardive, au cours des heures suivant une infection systémique. La réponse aux champignons entomopathogènes et aux bactéries Gram+ est contrôlée par la voie de signalisation Toll, qui induit la production de peptides antifongiques, tels que la drosomycine chez *Drosophila melanogaster* (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Les mutants de la voie de signalisation Toll sont plus sensibles à l'infection par *B. bassiana* et *M. anisopliae* (Lemaitre *et al.*, 1997). De plus, l'infection par un champignon induit la production de drosomycine, mais pas de peptide antibactérien (Lemaitre *et al.*, 1997), il existe donc des mécanismes de reconnaissance spécifiques. La protéine GGBP3 de *Drosophila* est un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) dédié à la reconnaissance des champignons (Gottar *et al.*, 2006). Le système immunitaire inné peut aussi détecter la protéase Pr1 des champignons entomopathogènes, qui déclenche la voie de signalisation Toll par l'intermédiaire de la protéase Persephone qui est activée par Pr1 par protéolyse (Gottar *et al.*, 2006).

Les champignons entomopathogènes ont développé des mécanismes puissants d'infection et de contournement des défenses de leurs hôtes au cours de leur évolution (Lu & St. Leger, 2016). L'oosporéine, une bibenzoquinone produite notamment par *B. bassiana*, contribue à la virulence du champignon en inhibant la réponse immunitaire de l'hôte (Feng *et al.*, 2015). Les destruxines de *Metarhizium* interfèrent avec l'expression des gènes codant pour les peptides antifongiques (Pal *et al.*, 2007). Certaines souches de *Beauveria* et de *Metarhizium* ont développé une résistance à la drosomycine (Lu *et al.*, 2015).

La défense la plus efficace de l'hôte pourrait reposer sur les comportements d'évitement (de Roode & Lefèvre, 2012). Certains insectes peuvent détecter les pathogènes, comme *Anthocoris nemorum* (Heteroptera: Anthocoridae) qui évite de se nourrir et de déposer ses œufs sur des plantes inoculées avec des conidies de *B. bassiana* (Meyling & Pell, 2006). Des comportements de nettoyage (« grooming ») ont été observés chez plusieurs insectes, comme chez les fourmis qui nettoient d'autres membres de leur colonie (Zhukovskaya *et al.*, 2013). Bos *et al.* (2015) ont montré que des fourmis choisissaient de consommer des substances nocives (dérivé réactif de l'oxygène) seulement lorsqu'elles étaient exposées à un

Synthèse bibliographique

champignon entomopathogène. Ces substances, nocives pour les fourmis saines, permettaient une meilleure survie des fourmis exposées au pathogène. Les abeilles sont capables de détecter et de retirer du nid des larves infectées par le champignon *Ascosphaera apis* (Onygenales : Ascosphaeraceae) (Swanson *et al.*, 2009). Les communautés microbiennes présentes sur la cuticule peuvent également intervenir dans l'immunité de l'insecte. Certaines bactéries isolées de la cuticule de *Delphacoes kuscheli* (Hemiptera: Cicadellidae) et *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) inhibent la germination de *B. bassiana* (Toledo *et al.*, 2011).

3. Spectre d'hôtes

Le spectre d'hôtes d'une espèce ou d'une souche de champignon entomopathogène est l'ensemble des espèces d'arthropodes qu'il est capable d'infecter (Brodeur, 2012). On distingue le spectre d'hôtes physiologique, qui correspond aux espèces que le champignon est capable d'infecter en laboratoire sous des conditions optimisées, du spectre d'hôtes écologique qui correspond aux hôtes infectés par le pathogène en conditions naturelles, dans l'environnement (Hajek & Goettel, 2007).

On considère généralement que le spectre d'hôtes écologique est plus restreint que le spectre physiologique et que c'est un meilleur indicateur du risque environnemental causé par le pathogène (Fargues & Remaudiere, 1977; Goettel *et al.*, 1990; Hajek & Goettel, 2007). Par exemple, dans le complexe d'espèces *Entomophthora muscae* (Entomophthorales : Entomophthoraceae), les études sur le spectre d'hôte physiologique montrent que des souches d'espèces de ce complexe sont capables d'infecter plusieurs espèces de diptères (Jensen *et al.*, 2006). Le spectre d'hôte écologique de chaque souche est en revanche limité à une seule espèce d'hôte, et ce pour quatre espèces identifiées du complexe *Entomophthora muscae* (Jensen *et al.*, 2006).

L'évaluation de ce spectre écologique est basée sur l'identification de souches isolées d'insectes contaminés collectés sur le terrain. Il est donc très difficile d'en avoir une image exhaustive, et ce spectre ne peut être étudié qu'une fois la souche introduite dans l'environnement (Hajek & Goettel, 2007).

Pour étudier le spectre d'hôte physiologique, on teste la pathogénicité et la virulence de souches de champignons entomopathogènes sur différents hôtes en les exposant au champignon, sous forme de conidies, blastospores ou produit formulé. Plusieurs approches peuvent être utilisées et combinées pour estimer la virulence des souches étudiées. Le taux de mortalité, à un temps et une dose donnés, est souvent employé comme estimateur de la

Synthèse bibliographique

virulence. L'utilisation de plusieurs doses d'inoculum permet de déterminer la dose létale nécessaire pour tuer 50 % de la population d'insecte (DL₅₀), ou la concentration létale (CL₅₀). Les tests à une seule dose suivis dans le temps permettent de calculer le temps moyen de survie ou le temps létal au bout duquel 50 % de la population est tuée (TL₅₀). Le développement externe du champignon sur le cadavre de l'insecte est un paramètre important car il témoigne de la capacité du champignon à effectuer un cycle biologique complet sur cet hôte et à se transmettre aux autres insectes de la même espèce (Hajek & St. Leger, 1994). D'autres paramètres non létaux peuvent être mesurés et comparés, comme la fécondité (Sookar *et al.*, 2014) ou la compétitivité sexuelle (Thaochan & Ngampongsai, 2015). La virulence d'une souche dépend des conditions environnementales (Svedese *et al.*, 2013), du type d'inoculum (Bernardo *et al.*, 2018) ou encore du mode d'application (Wraight & Ramos, 2015).

La spécificité d'hôte d'une souche, ou d'une espèce, de champignon entomopathogène peut se manifester par l'absence de pathogénicité sur une espèce d'insecte alors qu'elle est pathogène pour une autre espèce, ou bien par des niveaux différents de virulence sur différents hôtes dans les mêmes conditions. Par exemple, la même souche pourra entraîner des taux de mortalité plus faibles chez un hôte que chez l'autre, ou des TL₅₀ plus longs.

L'étude du spectre d'hôtes d'un agent de lutte biologique est indispensable pour déterminer ses effets indésirables possibles (Van Lenteren *et al.*, 2006; Zimmermann, 2007), mais aussi son potentiel économique (Glare *et al.*, 2012). Ces deux aspects ne peuvent pas être dissociés, car un agent avec un large spectre d'hôtes peut être utile contre de nombreuses espèces nuisibles, mais peut aussi être potentiellement dangereux pour des espèces non cibles (Brodeur, 2012; Glare *et al.*, 2012). La plupart des champignons entomopathogènes utilisés comme agents de lutte biologique sont capables d'infecter une large gamme d'hôtes, même si certains ont des spectres d'hôtes restreints (Faria & Wraight, 2007). Parmi ces derniers se trouvent principalement des champignons appartenant à l'ordre des Entomophthorales, dont les hôtes se limitent généralement à quelques espèces proches taxonomiquement (Jensen *et al.*, 2006; Pell *et al.*, 2001). L'espèce la plus souvent introduite comme agent de lutte biologique classique est *Entomophaga maimaiga* Humber (Entomophthoraceae), pathogène spécifique du bombyx disparate *Lymantria dispar* (L.), un ravageur des forêts (Hajek & Delalibera, 2010). Les champignons de l'ordre des Hypocreales qui sont le plus utilisés dans des stratégies d'inondation ou d'inoculation ont généralement un large spectre d'hôte. C'est le

Synthèse bibliographique

cas pour les genres *Beauveria* et *Metarhizium*, même si des différences de spectre sont souvent mentionnées à l'échelle de l'espèce ou de la souche.

Dans le genre *Beauveria*, *B. bassiana* est considérée comme une espèce généraliste car son spectre d'hôte, physiologique comme écologique, compte plus de 700 espèces d'arthropodes (Inglis *et al.*, 2001; Li, 1988). Le spectre d'hôtes écologique connu des morphes sexués de *Beauveria* comprend des espèces des ordres Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Phasmatodea et Blattodea (Kepler *et al.*, 2017). Une liste d'hôtes de *B. bassiana* publiée en 1988 comprenait 707 espèces d'insectes, de 521 genres et 149 familles répartis dans 15 ordres, ainsi que 13 espèces d'acariens dans sept genres et six familles (Li, 1988). Ce spectre d'hôtes inclut de nombreux ravageurs des cultures majeurs ainsi que des vecteurs de maladies humaines et animales comme les moustiques (Valero-Jiménez *et al.*, 2014), les mouches tsé-tsé (Maniania *et al.*, 2013) et les tiques (Kirkland *et al.*, 2004). *Beauveria brongniartii* est souvent considéré comme ayant un spectre d'hôtes plus restreint, comprenant principalement des coléoptères (Imoulan *et al.*, 2017; Shah & Pell, 2003; Vestergaard *et al.*, 2003). Il a toutefois été montré que le spectre d'hôtes écologique de cette espèce comprend au moins six ordres d'insectes (Leatherdale, 1970; Vestergaard *et al.*, 2003). Pour plusieurs autres espèces de *Beauveria*, comme *B. vermiconia* de Hoog & Rao ou *B. caledonica* Bisset & Widden, il existe trop peu de souches en collection pour conclure sur leur spectre d'hôtes (Rehner *et al.*, 2011). L'espèce *B. hoplocheli* a à ce jour seulement été isolée depuis le terrain du ver blanc *H. marginalis* (Robène-Soustrade *et al.*, 2015). Son spectre d'hôte physiologique reste encore largement inexploré, malgré quelques études préliminaires. Des souches de cette espèce étaient très peu virulentes voire non pathogènes contre le hanneton *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Neuvéglise *et al.*, 1997) et la cécidomyie des fleurs de manguier *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae), mais étaient pathogènes pour la fausse teigne de la cire *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Bricca *et al.*, 2014).

Dans le genre *Metarhizium*, certaines espèces sont généralistes, comme *M. anisopliae* et *M. robertsii* qui sont capables d'infecter des insectes de sept ordres (Hu *et al.*, 2014). D'autres espèces ont un spectre d'hôtes plus restreint, comme *M. acridum* qui est considérée comme une espèce spécialiste des criquets car son spectre d'hôte écologique est restreint à la famille des Acrididae (Bischoff *et al.*, 2009). Hu *et al.* (2014) ont montré par une analyse génomique que la spéciation chez *Metarhizium* était liée à la spécificité d'hôte. Les spécialistes ont évolué vers les généralistes, via des espèces au spectre intermédiaire, en parallèle de l'évolution de leurs hôtes. On ignore si la spéciation chez *Beauveria* a suivi une trajectoire évolutive similaire, en lien avec le spectre d'hôtes.

Synthèse bibliographique

Beauveria bassiana est l'espèce du genre *Beauveria* la plus utilisée en lutte biologique, avec la plus large gamme de cibles. C'est donc l'espèce dont le spectre d'hôtes est le plus étudié. Un grand nombre d'études ont comparé la virulence de plusieurs souches de *B. bassiana* sur une espèce de ravageur donnée (Carneiro *et al.*, 2008; Quesada-Moraga *et al.*, 2006a; Quesada-Moraga & Vey, 2003; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006; Todorova *et al.*, 1994; Valero-Jiménez *et al.*, 2014; Zare *et al.*, 2014). La plupart des études décrivent des différences de virulence et non de pathogénicité entre plusieurs souches de *B. bassiana*. Par exemple, Zare *et al.* (2014) ont testé la virulence de 17 souches de *B. bassiana* sur *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) et ont obtenu des mortalités comprises entre 25 et 60%. La virulence des souches a été corrélée à leur activité protéolytique.

Peu de travaux se sont intéressés au spectre d'hôtes physiologique de souches de *B. bassiana* en comparant la virulence des mêmes souches sur différentes espèces hôtes. Par exemple, la pathogénicité et la virulence de 43 souches de *B. bassiana* ont été testées sur huit espèces de Lépidoptères (Wraight *et al.*, 2010). Toutes les espèces ont été sensibles au pathogène, mais les niveaux de virulence, estimée par la CL₅₀, étaient très variables. De même, 29 souches représentatives de la diversité mondiale de *B. bassiana* ont été pathogènes pour neuf espèces d'insectes de cinq ordres différents, avec des différences significatives de virulence estimée par le taux de mortalité (Uma Devi *et al.*, 2008). Pour une même espèce d'insecte, la virulence des souches était différente selon l'origine de la population d'insectes, elle peut donc dépendre de la génétique des populations de l'hôte.

Certains travaux reposant sur différents marqueurs moléculaires montrent un lien entre la génétique des populations de *B. bassiana* et le spectre d'hôtes écologique des souches (Berretta *et al.*, 1998; Castrillo & Brooks, 1998; Cravanzola *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1997; Urtz & Rice, 1997). Ces études reposent sur un faible nombre de souches étudiées et leurs conclusions sont difficiles à généraliser. Des études plus récentes ne montrent pas de corrélation entre le génotype et le spectre d'hôtes (Bidochka *et al.*, 2002; Coates *et al.*, 2002a; Rehner & Buckley, 2005; Wang *et al.*, 2003). Il est possible que les souches de *B. bassiana* soient davantage adaptées à leur habitat qu'à des hôtes en particulier (Bidochka *et al.*, 2002). Le caractère généraliste des souches de *B. bassiana* leur confère probablement un avantage évolutif et participe à leur fitness écologique (Hu *et al.*, 2014).

La spécificité d'hôte peut dépendre de mécanismes qui stoppent l'infection à différents stades. Par exemple, les conidies de *M. acridum*, spécifique des criquets, sont capables de germer et de se différencier sur la cuticule d'un de ses hôtes, le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*

Synthèse bibliographique

(Orthoptera : Acrididae), mais ne germent pas sur le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera : Chrysomelidae) non hôte. Sur la cuticule de la cigale *Magicicada septendecim* (Hemiptera : Cicadidae), les conidies germent mais la différenciation de l'appressorium est très réduite (Wang & St. Leger, 2005). Des souches de *M. robertsii*, généralistes, et de *M. acridum* expriment des protéases différentes, qui pourraient avoir un rôle dans la spécificité d'hôte (Gao *et al.*, 2011). Les souches de *M. robertsii* possèdent jusqu'à 11 gènes *Pr1* (*Pr1A-K*), alors que *M. acridum* n'en possède que sept (Bagga *et al.*, 2004). Chez *B. bassiana*, des différences de virulence entre souches ont pu être liées à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la cuticule ou de protéines toxiques pour l'hôte (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010; Zare *et al.*, 2014). Des mécanismes de résistance spécifiques interviennent aussi du côté des hôtes. Par exemple, le coléoptère *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae), tolère de fortes doses de *B. bassiana* (Akbar *et al.*, 2004; Padín *et al.*, 2002; Padín *et al.*, 1997; Rice & Cogburn, 1999) grâce à la production de sécrétions cuticulaires défensives contenant de la benzoquinone, qui agissent contre les micro-organismes pathogènes (Pedrini *et al.*, 2010; Prendeville & Stevens, 2002). Ces sécrétions ont un effet fongistatique sur *B. bassiana*, et certaines souches ne causent que 20 à 25 % de mortalité chez *T. castaneum*. Le champignon produit en réponse une benzoquinone réductase (*BbBqrA*) qui détoxifie les benzoquinones (Pedrini *et al.*, 2015). La surexpression de *BbbqrA* provoque une augmentation de la virulence du champignon envers *T. castaneum* de 40-45%. Pour les auteurs, il s'agit d'un exemple de course aux armements évolutive entre le pathogène et son hôte dans la production / détoxification d'un composé cuticulaire antimicrobien, course dans laquelle le coléoptère est pour le moment en tête (Pedrini *et al.*, 2015).

IV. Ecologie des champignons entomopathogènes dans leur environnement

1. Outils de détection et d'identification des champignons entomopathogènes

Le sol est un habitat propice à la persistance des champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales. Ils y sont protégés du rayonnement UV, les températures sont modérées et l'humidité est favorable à leur développement (Jaronski, 2007). On retrouve ces champignons dans les sols de toute la planète, dans des habitats variés, cultivés ou non. *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* s. l. ont par exemple été isolés dans des régions tropicales et tempérées, ainsi que dans les régions subarctique et subantarctique (Fernandes *et al.*, 2009; Meyling *et al.*, 2012; Ormond *et al.*, 2010; Pérez-González *et al.*, 2014).

Synthèse bibliographique

La mise au point de méthodes pour suivre le devenir d'un agent de lutte biologique dans le sol est nécessaire pour suivre la rémanence du myco-insecticide dans les cultures mais aussi pour suivre sa dissémination et son impact sur les autres communautés microbiennes dans l'environnement.

Les méthodes traditionnelles nécessitent la ré-isolation et la culture du champignon à partir du sol traité et l'identification des isolats pour distinguer la souche introduite des champignons indigènes. Les méthodes culture-dépendantes permettant d'isoler et de quantifier l'inoculum présent dans le sol sont basées sur l'utilisation d'un milieu sélectif, contenant des fongicides et/ou antibiotiques (Butt & Goettel, 2000). Ces méthodes culture-dépendantes ont des inconvénients, elles sont longues et limitées aux champignons cultivables. Le piégeage sur insecte (Zimmermann, 1986) permet de cibler des champignons entomopathogènes. Les méthodes culture-indépendantes, directement sur l'ADN extrait des échantillons environnementaux sans isolement préalable, permettent une analyse plus globale des communautés fongiques du sol (Thomsen & Willerslev, 2015).

L'identification des champignons entomopathogènes a été basée ces dernières décennies sur de nombreuses techniques successives de biologie moléculaire. On peut citer l'utilisation des alloenzymes (St. Leger *et al.*, 1992), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) (Bidochka *et al.*, 1994), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Coates *et al.*, 2002b), ou encore le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) (Aquino de Muro *et al.*, 2003). Le développement de la PCR a permis d'utiliser la comparaison de séquences d'ADN de régions spécifiques pour identifier rapidement les champignons. Parmi les marqueurs pertinents permettant la détection de champignons entomopathogènes Hypocreales dans les sols, on trouve des gènes codant pour les enzymes de dégradation des organismes ciblés. Celui qui reste le plus utilisé est le gène *Pr1*, responsable de la production d'une protéase (St. Leger *et al.*, 1987). Il a été utilisé pour diagnostiquer la présence de *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. bassiana* (Leger *et al.*, 1996) ou encore *B. hoplocheli* (Costet *et al.*, en préparation). Un autre marqueur moléculaire largement utilisé pour identifier les champignons est l'ITS (Schoch *et al.*, 2012). Les récentes techniques de séquençage haut débit, comme le pyroséquençage 454 ou le séquençage par synthèse avec la technologie Illumina, permettent d'obtenir un grand nombre de séquences rapidement et à moindre coût (Shokralla *et al.*, 2012). Ces techniques permettent d'envisager l'étude des communautés microbiennes dans leur ensemble par métabarcoding. Pour les études de génétique des populations, des outils moléculaires basés sur les RFLP (Viaud *et al.*, 2000) ou RAPD (Cravanzola *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1997) ont longtemps été employés. L'outil le

Synthèse bibliographique

plus utilisé actuellement est le microsatellite (Enkerli *et al.*, 2001). Les séquences microsatellites, aussi appelés SSR pour « simple sequence repeat », sont des motifs d'ADN répétés, composées en général de 1 à 4 nucléotides. Ils sont distribués dans tout le génome. La longueur des microsatellites est extrêmement variable, ils peuvent donc être utilisés pour différencier des individus d'une même espèce et pour évaluer la diversité au sein d'une population. Dans le cadre du suivi d'un agent de lutte biologique au champ, les microsatellites permettent de détecter la souche introduite au sein d'une population indigène et dans le même temps de caractériser cette population indigène. Dans le genre *Beauveria*, des loci spécifique ont été développés pour les espèces *B. bassiana* (Rehner & Buckley, 2003) et *B. brongniartii* (Enkerli *et al.*, 2001).

2. Ecologie des Hypocreales dans le sol

Les champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales sont capables de survivre dans le sol sous forme de mycélium et de spores, mais ils sont peu compétitifs par rapport aux champignons saprophytes. Leur survie à long terme dépend en partie de la disponibilité d'hôtes sensibles (Keller & Zimmermann, 1989). L'infection et la colonisation d'un hôte sensible conduit à de fortes densités localisées de conidies infectieuses et à des opportunités importantes de nouvelles infections (Enkerli *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2003; Meyling & Eilenberg, 2007). L'usage d'un insecticide peut contribuer à la baisse de population d'un champignon entomopathogène, soit en ayant un effet fongicide, soit en réduisant la disponibilité de ses hôtes (Klingen *et al.*, 2002).

La persistance d'un champignon entomopathogène dépend beaucoup de facteurs abiotiques comme la température, l'humidité ou le rayonnement solaire, mais aussi de facteurs biotiques, notamment les interactions avec les micro-organismes du sol (Jaronski, 2007). Dans le cas de *B. bassiana*, les températures optimales de germination et croissance sont comprises entre 23°C et 28°C avec des variations entre les différentes souches (Fargues *et al.*, 1997; Hallsworth & Magan, 1999). Des températures plus froides, d'environ -15° C, ont un effet fongistatique mais ont un impact très faible sur la viabilité des conidies. Par contre, après un délai de dix jours dans des sols à 55°C, les conidies ne sont plus viables (Fernandes *et al.*, 2007; Lingg & Donaldson, 1981). Les conidies de *B. bassiana* germent lorsque l'activité de l'eau a_w est comprise entre 0,90 et 0,998 (Hallsworth & Magan, 1999). Les conidies de *B. bassiana* sont rapidement dégradées par le rayonnement solaire, avec des variations de tolérance aux UV-B en fonction des souches (Fernandes *et al.*, 2007). Les conidies de

Synthèse bibliographique

B. bassiana et celles d'autres champignons entomopathogènes appliquées lors d'un traitement sur les organes aériens d'une plante sont donc rapidement inactivées par le rayonnement solaire et les hautes températures, alors que le sol offre une meilleure protection (Hajek, 1997).

La survie des champignons entomopathogènes est généralement supérieure dans des sols stérilisés plutôt que non stérilisés (Lingg & Donaldson, 1981). Certains micro-organismes du sol peuvent inhiber la croissance et la germination des champignons, voire être directement toxiques, en libérant des métabolites dans le sol. Sharma *et al.* (1999) ont montré que les champignons telluriques *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Rhizoctonia bataticola* et *Aspergillus niger* inhibaient la croissance d'isolats de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, et *M. anisopliae*.

La prévalence des champignons entomopathogènes dans les sols cultivés est également influencée par l'espèce de plante cultivée et par les pratiques agricoles (Klingen *et al.*, 2002). Plusieurs études ont observé que les densités de *B. bassiana* et *M. anisopliae* étaient plus élevées dans des agrosystèmes sans labour (Bing & Lewis, 1993; Hummel *et al.*, 2002; Sosa-Gomez & Moscardi, 1994), alors que d'autres constatent le contraire (Jabbour & Barbercheck, 2009; Kepler *et al.*, 2015). Klingen and Haukeland (2006) ont réalisé une revue des effets de pesticides de synthèse sur les champignons entomopathogènes et concluent que les herbicides et les insecticides n'ont pas beaucoup d'incidence sur la croissance des champignons, contrairement aux fongicides. Certains entomopathogènes, comme *M. anisopliae*, sont plus souvent associés à des milieux agricoles qu'à des habitats naturels (Bidochka *et al.*, 2001). Mais en général, la prévalence et la diversité des champignons entomopathogènes sont supérieures dans les habitats semi-naturels comparés aux habitats cultivés (Meyling & Eilenberg, 2007; Meyling *et al.*, 2009). Les études de Bidochka *et al.* sur *B. bassiana* (2002) et *M. anisopliae* (2001) ont montré que les souches isolées dans des habitats agricoles étaient capables de se développer à des températures plus élevées et étaient moins sensibles au rayonnement UV que des souches provenant d'habitats forestiers. La structure des populations des champignons entomopathogènes est très liée à leur habitat (Bidochka *et al.*, 2001; Bidochka *et al.*, 2002; Meyling & Eilenberg, 2007; Meyling & Hajek, 2010; Meyling *et al.*, 2009).

3. Les champignons entomopathogènes comme endophytes

Certaines espèces de champignons entomopathogènes sont capables d'avoir une interaction avec les plantes. On définit un endophyte comme un micro-organisme qui vit à l'intérieur de tissus végétaux sans causer de symptômes (Hyde & Soyong, 2008). On retrouve des champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales à l'état endophyte, soit naturellement soit à la suite d'une inoculation (Vega *et al.*, 2008). Par exemple, *B. bassiana* est capable de coloniser plusieurs plantes cultivées, comme le maïs (Wagner & Lewis, 2000), le cacao (Posada & Vega, 2005), le caféier (Posada *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2008) le pavot à opium (Quesada-Moraga *et al.*, 2006a) et la canne à sucre (Donga *et al.*, 2018). Les études concernant l'introduction de champignons entomopathogènes comme endophytes ont pour but leur utilisation pour protéger les cultures contre des ravageurs spécifiques. Une forte diminution des dégâts causés par la pyrale *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera : Pyralidae) sur du maïs (*Zea mays*) traité avec une formulation de *B. bassiana* a été liée à un établissement du champignon comme endophyte dans le maïs (Bing & Lewis, 1991; Bing & Lewis, 1993). Des effets ont également été observés sur les dégâts causés par *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) sur le maïs (Cherry *et al.*, 2004). Les mécanismes expliquant ces effets sont encore mal connus, il pourrait s'agir de la production de métabolites secondaires insecticides (Vega *et al.*, 2008). Les champignons entomopathogènes endophytes peuvent également protéger les plantes contre certaines maladies (Ownley *et al.*, 2008), par exemple la tomate et le coton contre *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum* et *Xanthomonas malvacearum* ou favoriser la croissance des plantes. Autre exemple, *Metarhizium roberstii* sous forme d'endophyte favorise la croissance racinaire de la « switchgrass » (*Panicum virgatum*) et du haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Sasan & Bidochka, 2012) et est antagoniste du champignon phytopathogène *Fusarium solani* (Sasan & Bidochka, 2013).

Le fait que beaucoup de champignons entomopathogènes puissent survivre comme pathogènes, saprophytes ou endophytes montre que ces organismes ont développé des mécanismes variés au cours de leur évolution, qui leur permettent de s'adapter à différents environnements et modes de nutrition (Moonjely *et al.*, 2016; St. Leger *et al.*, 2011).

4. Persistance des myco-insecticides et effets sur les communautés fongiques indigènes

Pour un produit de lutte biologique, si une persistance de longue durée peut être utile pour permettre un contrôle durable de l'insecte ciblé, elle peut également augmenter le risque

Synthèse bibliographique

d'impact sur les organismes non cibles (Laengle & Strasser, 2010). Les champignons entomopathogènes peuvent persister dans le sol sous forme de mycélium dans des insectes momifiés, de conidies ou de blastospores après application (Keller & Zimmermann, 1989). Le caractère saprophyte des Hypocreales leur permet de survivre sans la présence d'hôtes. Par exemple, *Metarhizium* est capable de se maintenir à proximité des racines de plantes, en utilisant comme ressources des substances sécrétées par les racines (Sasan & Bidochka, 2012).

Il est très difficile de prévoir la persistance d'un champignon entomopathogène dans le sol car elle dépend de nombreux facteurs biotiques (disponibilité de l'hôte, micro-organismes du sol) et abiotiques (humidité, température, type de sol), ainsi que de l'espèce et même de la souche utilisée (Scheepmaker & Butt, 2010). En analysant des études de persistance basées sur ces méthodes, Scheepmaker & Butt (2010) ont conclu à une diminution au cours du temps de l'abondance de trois espèces (*B. bassiana*, *B. brongniartii* et *M. anisopliae*) appliquées en champs cultivés et prairies dans le monde. Ils ont estimé que la quantité d'inoculum introduit baisse petit à petit jusqu'à disparaître ou revenir aux quantités présentes initialement avant traitement (estimé à 1000 CFU/g de sol) en 0,5-1,5 ans pour *B. bassiana*, environ quatre ans pour *B. brongniartii* et 10 ans pour *M. anisopliae*. Enkerli *et al.* (2004) ont montré que la souche de *B. brongniartii* utilisée par inoculation pour le contrôle de *Melolontha melolontha* en Suisse pouvait persister dans le sol pendant 14 ans après application. En identifiant les souches présentes en utilisant des marqueurs microsatellites, ils démontrent également que les souches de *B. brongniartii* utilisées en lutte biologique peuvent coexister avec des souches indigènes de *B. brongniartii* dans le même habitat. Ces résultats ont été confirmés par Mayerhofer *et al.* (2015) dans la région du Tyrol (Autriche et Italie) où une souche de *B. brongniartii* a été utilisée comme agent de lutte biologique pendant plusieurs années, d'autres souches de *B. brongniartii* et de *Beauveria* spp. (*B. bassiana* et *B. pseudobassiana*) ont été détectées démontrant que des souches indigènes peuvent se maintenir et coexister dans le même habitat. La souche commerciale était capable de se maintenir pendant des années, jusqu'à 15 ans après traitement, mais sa prévalence baissait fortement au cours du temps. Les auteurs estiment que le facteur principal expliquant cette baisse était la faible densité, voire l'absence de l'hôte.

L'effet d'une souche introduite dans le cadre d'une stratégie de lutte biologique sur la communauté fongique indigène peut être direct (suppression, antibiose) ou indirect (compétition pour les ressources) (Hirsch *et al.*, 2013). L'effet d'une souche introduite de *B. brongniartii* a été évalué en milieu contrôlé en comparant les profils ITS des communautés

Synthèse bibliographique

fongiques après plusieurs applications de cette souche (Schwarzenbach *et al.*, 2009) et seul un très faible effet, non durable, a été détecté sur la diversité et la richesse spécifique ainsi que sur la structure des communautés fongiques indigènes. Hirsch *et al.* (2013) ont suivi pendant sept semaines le devenir et l'impact potentiel d'une souche de *B. bassiana* introduite sur la diversité spécifique des communautés fongiques du sol dans un champ cultivé en Inde. Ils ont utilisé pour cela la méthode de métabarcoding de l'ITS1 par pyroséquençage 454 et le génotypage microsatellite. Aucun effet n'a été détecté. Les résultats indiquent également que la souche de *B. bassiana* s'est propagée de la parcelle traitée à la parcelle témoin distante de 15 mètres. Mais les auteurs relèvent qu'avec les méthodes de détection culture-indépendantes utilisées, on ne sait rien de la viabilité et de la virulence des propagules présentes, il est en effet possible d'amplifier de l'ADN de cellules fongiques mortes ou de conidies sénescents. Les auteurs concluent qu'il serait intéressant de combiner ces méthodes moléculaires avec des méthodes de piégeage, comme le *Galleria*-bait, afin d'évaluer la pathogénicité de l'agent de lutte biologique fongique appliqué (Hirsch *et al.*, 2013).

V. Objectifs de la thèse

La synthèse bibliographique souligne l'importance d'acquérir des connaissances approfondies sur l'écologie et le spectre d'hôte d'un champignon entomopathogène lors du choix d'un agent de lutte biologique. Le développement d'un produit contenant cet agent doit s'inscrire dans une stratégie globale incluant une réflexion sur une formulation et un mode d'application adaptés à l'écologie du ravageur ciblé. Il est également primordial de développer des outils permettant le suivi de l'agent une fois introduit et l'évaluation de son efficacité et de ses éventuels effets non-intentionnels.

La société BETEL-Réunion, partenaire du projet de thèse, est une filiale du groupe Arysta LifeScience. Arysta LifeScience produit deux souches de *B. bassiana* qui ont récemment été homologuées en Europe. La souche I-2960 est commercialisée en France dans le produit Ostrinil[®], utilisé pour lutter contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* et contre les ravageurs des palmiers, notamment le papillon *Paysandisia archon* Burmeister (Lepidoptera: Castniidae). La souche I-2961 a été homologuée pour un usage contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera : Curculionidae) et contre le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera : Dryophthoridae) (Besse *et al.*, 2013). BETEL-Réunion produit la souche B507 de *B. hoplocheli*, substance active du

Synthèse bibliographique

Betel, pour lutter contre *H. marginalis* en champ de canne à sucre. Ce produit n'est pas homologué et est autorisé par arrêté ministériel uniquement à La Réunion dans le cadre de la lutte obligatoire décrétée par arrêté préfectoral contre les "vers blancs". Pour l'entreprise, un des enjeux est d'élargir les usages des souches de *B. bassiana* homologuées afin d'augmenter leurs parts de marché et de rentabiliser les coûts d'homologation. Il s'agit également de développer des méthodes d'utilisation innovantes et adaptées aux nouveaux ravageurs visés. Un autre enjeu est d'améliorer les connaissances sur la spécificité, la persistance et la dispersion des souches commerciales dans l'environnement, autant d'éléments nécessaires pour l'évaluation de l'impact de ces organismes et leur suivi post-homologation.

Les objectifs de la thèse sont les suivants:

- Etudier le spectre d'hôtes physiologique de trois souches commerciales de *Beauveria* spp. Cela permettra de développer les connaissances sur la spécificité des souches de *B. bassiana* en vue d'élargir leurs usages à d'autres hôtes. Le spectre d'hôtes de l'espèce *B. hoplocheli* est aujourd'hui très mal connu et cette étude apportera des éclairages sur son potentiel comme agent de lutte biologique et son impact possible sur les espèces non cibles.
- Développer une méthode de lutte biologique innovante contre les mouches des fruits basée sur l'auto-dissémination d'une souche homologuée de *B. bassiana*. Nous évaluerons, chez la mouche du melon, la capacité de transmission horizontale des mâles aux femelles lors de l'accouplement des spores de *B. bassiana*.
- Evaluer la durabilité de la lutte biologique contre *Hoplochelus marginalis* à La Réunion en réalisant un suivi de la souche commerciale et de la diversité génétique de *B. hoplocheli* au cours d'un cycle de culture. Pour cela, un réseau de parcelles de canne à sucre sera mis en place et des techniques seront développées pour détecter et identifier précisément le champignon.

Synthèse bibliographique

-

Chapitre 1 : Evaluation du spectre d’hôtes physiologique de trois souches de *Beauveria* spp.

Contexte

La spécificité d’hôte d’un champignon entomopathogène est un des critères fondamentaux à étudier préalablement au choix d’une souche pour le développement d’un produit de lutte biologique. Les connaissances sur le spectre d’hôtes permettent de déterminer les usages et donc le potentiel économique d’un agent de lutte biologique, mais également d’estimer son impact sur les organismes non-cibles. Cela permet notamment de savoir si l’agent sera potentiellement dangereux pour les insectes auxiliaires de culture tels que les pollinisateurs ou les prédateurs des ravageurs. Au sein du genre *Beauveria*, on connaît mal le lien entre spectre d’hôtes et spéciation. L’espèce *B. bassiana* est connue pour avoir un très large spectre d’hôtes physiologique et écologique (Inglis *et al.*, 2001; Li, 1988). Il a aussi été montré que la virulence sur un hôte pouvait varier selon les souches de *B. bassiana* (Carneiro *et al.*, 2008; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006; Todorova *et al.*, 1994; Zare *et al.*, 2014). Il existe en revanche peu d’études qui ont testé la même souche de *Beauveria* sur plusieurs insectes. Le spectre d’hôtes de l’espèce *B. hoplocheli* est très peu connu, celle-ci n’ayant été isolée que sur le coléoptère *H. marginalis* dans l’environnement (Neuvéglise *et al.*, 1994; Robène-Soustrade *et al.*, 2015).

Approche

Notre objectif était d’étudier le spectre d’hôtes physiologique de trois souches appartenant à deux espèces du genre *Beauveria*: les souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* et la souche B507 de *B. hoplocheli*. Pour l’entreprise Arysta Lifescience, l’enjeu est de pouvoir élargir les usages des souches homologuées en identifiant de nouveaux insectes sensibles. Cela permettra de rentabiliser le long et coûteux processus d’homologation des souches I-2960 et I-2961. Pour répondre à cet objectif, nous avons réalisé des tests de pathogénicité en laboratoire, en testant une dose des trois souches sur neuf espèces d’insectes ravageurs, appartenant à trois ordres : Coleoptera, Diptera et Lepidoptera. Nous avons mesuré les taux de mortalité, les temps moyens de survie et les taux de mycoses pour estimer et comparer la virulence des souches.

Résultats et discussion

Notre étude a révélé des différences de spectres d’hôtes des trois souches de *Beauveria* spp. Les trois souches étaient pathogènes pour toutes les espèces de diptères et de lépidoptères testées. En revanche, pour les coléoptères, seule la souche de *B. hoplocheli* était pathogène pour le ver blanc *H. marginalis* et seules les souches de *B. bassiana* étaient pathogènes des larves du coléoptère *Alphitobius diaperinus*. La souche de *B. hoplocheli* était moins virulente sur diptères et lépidoptères que les deux souches de *B. bassiana*. Le large spectre d’hôtes physiologique des trois souches ouvre de nouvelles perspectives pour leur utilisation en lutte biologique. Les deux souches de *B. bassiana* sont par exemple de bonnes candidates pour lutter contre les mouches des fruits. La souche B507 de *B. hoplocheli* reste la seule disponible sur le marché pour contrôler le ver blanc *H. marginalis*. Des études sur l’écologie de ces souches en milieu naturel et sur leur spectre d’hôtes écologique sont nécessaires pour évaluer le risque sur les espèces non-cibles.

Article 1 : publié le 05/07/2018 dans la revue PLoS One

Rohrlich, C., Merle, I., Mze Hassani, I., Verger, M., Zuin, M., Besse, S., Robène, I., Nibouche, S., Costet, L. (2018) Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *PLoS One*, 13(7). • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199199>

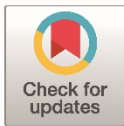
RESEARCH ARTICLE

Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*

Clara Rohrlich^{1,2,3}, Isabelle Merle¹, Issa Mze Hassani⁴, Manon Verger¹, Michel Zuin², Samantha Besse⁵, Isabelle Robène¹, Samuel Nibouche¹, Laurent Costet^{1*}

1 CIRAD, UMR PVBMT, Saint-Pierre, La Réunion, France, **2** Arysta LifeScience Group, BETEL Réunion, Saint-Benoit, La Réunion, France, **3** Université de la Réunion, UMR PVBMT, Saint-Pierre, La Réunion, France, **4** INRAPE, Moroni, Union des Comores, **5** Arysta LifeScience Group, NPP, Pau, France

* laurent.costet@cirad.fr


 OPEN ACCESS

Citation: Rohrlich C, Merle I, Mze Hassani I, Verger M, Zuin M, Besse S, et al. (2018) Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. PLoS ONE 13(7): e0199199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199199>

Editor: Wolfgang Arthofer, University of Innsbruck, AUSTRIA

Received: March 10, 2018

Accepted: June 4, 2018

Published: July 5, 2018

Copyright: © 2018 Rohrlich et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw data is available in Rohrlich, Clara; Merle, Isabelle; Mze Hassani, Issa; Verger Manon; Zuin Michel; Besse Samantha; Robène Isabelle; Nibouche Samuel; Costet Laurent, 2018, "Raw data for Rohrlich et al. 2018 PLOS ONE Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*", doi:[10.18167/DVN1/CBONRN](https://doi.org/10.18167/DVN1/CBONRN). All other relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Abstract

Knowledge of the host range of a biocontrol agent (BCA) is fundamental. Host range determines the BCA's economic potential, as well as the possible risk for non-target organisms. Entomopathogenic fungal strains belonging to the genus *Beauveria* are widely used as BCA, but our knowledge of their physiological host range is only partial. The aim of this study was to improve our understanding of the physiological host range of three *Beauveria* strains belonging to two species, *B. hoplocheli* and *B. bassiana*. We performed laboratory mortality bioassays to assess their pathogenicity and virulence against nine insect pests, belonging to three orders: Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. Mortality rate, mean survival time and mycosis rate were used to estimate virulence. Pathogenicity was assessed as the capacity to cause a disease and induce mortality. Virulence was assessed as the severity of the disease based on mortality rate, mean survival time and mycosis rate. The results of this study revealed significant differences in the physiological host range of the three *Beauveria* strains tested. The three strains were pathogenic to all Diptera and Lepidoptera species tested. In the case of the Coleoptera, only the *B. hoplocheli* strain was pathogenic to the white grub *Hoplochelus marginalis* and only the *B. bassiana* strains were pathogenic to *Alphitobius diaperinus*. The *B. hoplocheli* strain was less virulent on Lepidoptera and Diptera than the two *B. bassiana* strains. The latter both exhibited very similar virulence patterns. The fact that *B. hoplocheli* and *B. bassiana* strains have different host ranges means that they can be used as BCA to target different pests. Impacts on non-target insects across multiple orders cannot be ruled out in the absence of ecological host range studies.

Introduction

Host specificity or host range of an entomopathogenic fungus can be defined as the number and taxonomic diversity of the hosts it can infect [1]. Knowledge of the host range of a

Article 1: Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*

Clara Rohrllich^{1,2,3}, Isabelle Merle¹, Issa Mze Hassani⁴, Manon Verger¹, Michel Zuin²,
Samantha Besse⁵, Isabelle Robène¹, Samuel Nibouche¹ and Laurent Costet¹

¹ CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

² Arysta LifeScience Group, BETEL Réunion, F-97470 Saint-Benoit, La Réunion, France

³ Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

⁴ INRAPE, Moroni, Union des Comores

⁵ Arysta LifeScience Group, NPP, F-64000 Pau, France

Abstract

Knowledge of the host range of a biocontrol agent (BCA) is fundamental. Host range determines the BCA's economic potential, as well as the possible risk for non-target organisms. Entomopathogenic fungal strains belonging to the genus *Beauveria* are widely used as BCA, but our knowledge of their physiological host range is only partial. The aim of this study was to improve our understanding of the physiological host range of three *Beauveria* strains belonging to two species, *B. hoplocheli* and *B. bassiana*. We performed laboratory mortality bioassays to assess their pathogenicity and virulence against nine insect pests, belonging to three orders: Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. Mortality rate, mean survival time and mycosis rate were used to estimate virulence. Pathogenicity was assessed as the capacity to cause a disease and induce mortality. Virulence was assessed as the severity of the disease based on mortality rate, mean survival time and mycosis rate. The results of this

study revealed significant differences in the physiological host range of the three *Beauveria* strains tested. The three strains were pathogenic to all Diptera and Lepidoptera species tested. In the case of the Coleoptera, only the *B. hoplocheli* strain was pathogenic to the white grub *Hoplochelus marginalis* and only the *B. bassiana* strains were pathogenic to *Alphitobius diaperinus*. The *B. hoplocheli* strain was less virulent on Lepidoptera and Diptera than the two *B. bassiana* strains. The latter both exhibited very similar virulence patterns. The fact that *B. hoplocheli* and *B. bassiana* strains have different host ranges means that they can be used as BCA to target different pests. Impacts on non-target insects across multiple orders cannot be ruled out in the absence of ecological host range studies.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Beauveria hoplocheli*, pathogenicity, virulence, host range.

Introduction

Host specificity or host range of an entomopathogenic fungus can be defined as the number and taxonomic diversity of the hosts it can infect [1]. Knowledge of the host range of a biocontrol agent (BCA) is fundamental because host range determines the BCA's possible risk for the environment [2] and economic potential [3]. These two aspects are somewhat correlated, given that a BCA with a broad host range may be lethal for a wide range of target pests and also potentially for a broad range of non-target species [1, 3]. The ecological host range refers to the range of species that an entomopathogenic fungus infects in field conditions. The physiological host range is the range that the pathogen is able to infect under optimized conditions, determined by laboratory tests [4]. The ecological host range is usually considered to be narrower than the physiological host range and a better estimator of the risk for the environment [4-6]. However, assessing the ecological host range of a BCA is a complex task and can only be achieved once the BCA has been introduced in the environment

[4]. Thus, the question of host range is not usually explored fully, which means there are gaps in our knowledge. Generally, the characterization of a BCA's host range is drawn from our knowledge of the hosts on which the strain was collected in natural conditions and a few laboratory pathogenicity tests [7]. In invertebrate pathology, pathogenicity is defined as the capacity to cause a disease to a given host and virulence is defined as the severity of the disease [8, 9]. Different approaches can be used and combined to estimate the virulence of a pathogen. Dose-mortality experiments determine the median lethal dose or concentration, which causes the death of 50 % of the test insects; while single dose time-mortality experiments are used to determine the mean survival time or the median lethal time at which 50 % of the test insects have died; and fungal growth on the host cadaver can be checked to ascertain completion of the fungal biological cycle [10]. Reduction of other fitness parameters can also be measured, such as fecundity or offspring survival [4].

Entomopathogenic fungi used as commercial BCA have diverse host ranges. Most are capable of infecting a wide range of hosts, although a few have a narrow host range [11]. Fungi belonging to the Entomophthorales order (Entomophthoromycota phylum) tend to have a narrow ecological and physiological host range limited to a small number of taxonomically related species [12, 13]. They include many obligate biotrophic insect pathogens, like all the species belonging to the Entomophthoraceae family [14]. They are difficult to mass-produce and are used primarily for classical biological control with a view to the permanent establishment of the exotic BCA [15]. In contrast, fungi used in inundative or inoculative strategies, involving the regular release of the BCA, have to be mass-produced. The fungi used in these strategies belong mainly to the Hypocreales order (Ascomycota phylum). They are hemibiotrophic and generally have a broad host range [11]. However, among Hypocreales, differences in host range are often mentioned at the species or strain level.

In the genus *Beauveria*, *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin is recognized as a generalist species with a broad ecological host range of more than 700 arthropod species, which covers most orders of the class Insecta [6, 16]. *B. brongniartii* (Saccardo) Petch is often claimed to have a more restricted host range, infecting mostly Coleoptera [17-19]. However, this fungus species has been reported to infect insects from at least seven orders in the field [18, 20]. For several other species, such as *B. vermiconia* de Hoog & Rao or *B. caledonica* Bisset & Widden, the number of strains available in collections is too small to draw conclusions about their host range [21]. To date, the species *B. hoplocheli* Robène-Soustrade & Nibouche (formerly described as *B. brongniartii* or *B. tenella*) has only been isolated in natural conditions from the white grub *Hoplochelus marginalis* (Fairmaire) (Coleoptera: Scarabaeidae) [22]. It is used as a BCA against this pest in Réunion Island [23]. Despite a few preliminary studies, the physiological host range of *B. hoplocheli* has not been investigated extensively. In laboratory bioassays, *B. hoplocheli* exhibited little or no virulence to *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) [24] and to the mango blossom gall midge *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae), but was pathogenic to the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [25].

Many studies have compared the virulence of several strains of *Beauveria* spp. on a given insect host, especially strains of *B. bassiana* [26-32]. Few works have studied the physiological host range of *Beauveria* spp. strains by comparing their pathogenicity and virulence on several insect species. For example, 43 *B. bassiana* strains collected worldwide exhibited a strong variation in virulence against eight lepidopteran species [33]. Twenty-nine genetically diverse *B. bassiana* strains were pathogenic to nine insect species from five orders, with significantly different levels of virulence [34].

Few studies demonstrate that *Beauveria* strains or species may differ in their physiological host range, despite the importance of these differences regarding their use as BCA. Therefore,

the aim of this study was to characterize the physiological host range of three *Beauveria* strains belonging to two species, *B. hoplocheli* and *B. bassiana*. We tested their pathogenicity and their virulence against nine insect pests, belonging to three orders: Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. Mortality rate, mean survival time and mycosis rate were used as estimators of the virulence in single dose mortality bioassays.

Materials and Methods

Beauveria strains and spore suspensions

Two strains of *B. bassiana* (I-2960, I-2961) and one strain of *B. hoplocheli* (B507), were obtained from Arysta LifeScience. The strains were stored at -80°C using Microbank cryovials (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canada). Cultures were grown from the cryovial stored strains to prepare spore suspensions for the tests. All cultures were grown at 25°C on potato dextrose agar (PDA) medium until sporulation was observed (three to four weeks). Spore suspensions were prepared by scraping the surface of sporulated cultures and suspending conidia in a sterile solution of 0.05% TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Conidia suspensions were adjusted to 10⁶ or 10⁸ conidia mL⁻¹ using a Malassez hemocytometer. To determine conidia viability and the number of conidia per milliliter, 100 µL of the conidia suspension was plated onto PDA, incubated at 25°C and the colony forming units were counted after five days.

Insects

The pathogenicity of the three *Beauveria* spp. strains was evaluated on nine insect species belonging to three orders: Diptera, Coleoptera and Lepidoptera (Table 1). We performed pathogenicity tests on five fruit flies found in Réunion: the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders), the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), the Mascarene fruit fly, *C. catoiri* (Guérin-Méneville) endemic in Réunion, the Indian Ocean cucumber fly, *Dacus*

Chapitre 1 – Spectre d'hôtes

demmerezi (Bezzi) and the melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett). Tests were also carried out on the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), an invasive species not recorded in Réunion at the time of the study, but present in most islands in the western region of the Indian Ocean, including Comoros [35]. Fruit fly strains of *B. zonata*, *C. capitata* and *C. catairii* were reared on artificial diets [36] in our laboratory for 138, 17 and 157 generations, respectively. *D. demmerezi* and *Z. cucurbitae* were reared on zucchini for 22 and 64 generations, respectively. Sugarcane white grub *H. marginalis* larvae were collected in the field with permission of the owner from plots of sugarcane (Saint-Benoît, Réunion; 20°59'41.05" S, 55°41'16.63" E) and thyme (Petite-Ile, Réunion; 21°20'3.57" S, 55°33'22.13" E). *H. marginalis* larvae were kept in the laboratory in clean soil, fed with pieces of carrot and quarantined for 20 days to ensure that they were free from entomopathogenic fungal infections. The lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) strain was collected from a poultry farm with permission of the owner (Saint-André, Réunion; 20°56'52.0" S, 55°39'41.2" E). *A. diaperinus* larvae were maintained on wood shavings and fed with poultry feed pellets until treatments. Larvae of *G. mellonella* came from a strain reared in our laboratory on an artificial diet adapted from Meyling [37].

Table 1. Insects used in bioassays.

Species	Common name	Order	Family	Stage	No. insects per treatment	Conidia suspension (conidia.mL ⁻¹)
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Oriental fruit fly	Diptera	Tephritidae	Adult	90	10 ⁶
<i>Bactrocera zonata</i>	Peach fruit fly	Diptera	Tephritidae	Adult	90	10 ⁶
<i>Ceratitis capitata</i>	Mediterranean fruit fly	Diptera	Tephritidae	Adult	90	10 ⁶
<i>Ceratitis catairii</i>	Mascarene fruit fly	Diptera	Tephritidae	Adult	90	10 ⁶
<i>Dacus demmerezi</i>	Indian Ocean cucurbit fly	Diptera	Tephritidae	Adult	90	10 ⁶
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	Melon fly	Diptera	Tephritidae	Adult	150	10 ⁶
<i>Alphitobius diaperinus</i>	Lesser mealworm	Coleoptera	Tenebrionidae	Larva	90	10 ⁸
<i>Hoplochelus marginalis</i>	Sugarcane white grub	Coleoptera	Scarabaeidae	Larva (3rd instar)	90	10 ⁸
<i>Galleria mellonella</i>	Greater wax moth	Lepidoptera	Pyrilidae	Larva	390	10 ⁶ and 10 ⁸

Bioassays

Bioassays were conducted on two insect species at a time, using *G. mellonella* for all bioassays. Each bioassay compared four modalities: the three *Beauveria* strains B507, I-2960 and I-2961, and an untreated control. Each modality was carried out on 30 insects. For fruit flies, 12 to 14-day-old adults were used, with 15 males and 15 females. Strain B507 was not tested on *C. catovirii*. Each bioassay was repeated three times. The experiments were conducted from May 2015 to August 2016 in the CIRAD laboratory (Réunion). Since *B. dorsalis* was not recorded in Réunion at the time of the study, bioassays for this species were conducted in the INRAPE laboratory (Comoros).

Insect contamination was realized by dipping the insects in the conidia suspension for 10 seconds. Adult fruit flies were anaesthetized with CO₂ prior to treatment and dipped in a suspension at 10⁶ conidia mL⁻¹. This concentration is in the range of the LC₅₀ (lethal concentration required to kill 50 % of the target insects) of several *B. bassiana* strains tested on fruit flies [38-40]. Preliminary bioassays showed that using 10⁶ conidia mL⁻¹, the mortality was similar to control for *A. diaperinus* and *H. marginalis* larvae for all strains tested. Therefore, the insects were treated with suspensions at 10⁸ conidia mL⁻¹. Untreated control fruit flies were anaesthetized with CO₂ and then dipped in a 0.05% TWEEN® 80 solution like all other control insects.

After treatment, all insects were kept separately in 125 mL plastic containers (flies and white grubs), and 30 mL plastic containers (*G. mellonella* and *A. diaperinus* larvae). Adult flies were fed three times a week with a liquid diet containing a 10:1 mix of sucrose and yeast enzymatic hydrolysate (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). After dipping, *G. mellonella* larvae were fed with a 400 mg piece of beeswax and *A. diaperinus* larvae were fed with a few poultry feed pellets. *H. marginalis* larvae were kept in sterilized peat and fed once a week with slices of organically grown carrots.

Insect mortality was recorded daily for 30 days for the fruit flies and every other day for the other species. Insects were considered dead if they were unable to produce coordinated movements or showed no response when touched. Cadavers were surface-sterilized in 70% ethanol for five seconds, rinsed in sterile distilled water for five seconds and placed on a sterilized filter paper, moistened with 200 μL sterile distilled water, in a 55 mm vented Petri dish to stimulate external fungal growth. Development of mycosis was checked 10 days after death.

Data analysis

The aim of the first analysis was to compare the effect of the treatments on two variables used to estimate virulence: mortality rate and mycosis rate. The mycosis rate was calculated as the percentage of cadavers showing external fungal growth out of the total number of tested insects. The experimental design allowed us to compare four treatments on two insect species in each bioassay. The presence of *G. mellonella* in each bioassay allowed an estimation of the bioassay effect as a fixed replication effect and the design was thus analysed as a classical factorial design. As two spore suspensions were used at 10^6 or 10^8 conidia.mL⁻¹, we conducted separate analyses on the bioassays using each of the two doses. The analysis of the mycosis rate for bioassays using a 10^8 conidia.mL⁻¹ could not be performed due to missing data for *G. mellonella*. We conducted the analysis with a generalized linear model using a binomial distribution and a logit link with SAS GLIMMIX procedure [41]. The model included insect species, treatments, insect species x treatment interaction, bioassays and bioassays x treatments interaction as fixed factors. To solve some convergence issues, maximum likelihood with Laplace approximation was preferred to the default pseudo-likelihood technique. The insects used in the experiments had a different life span and different developmental stages (adult or larva). Therefore, the mean survival time for control insects

varied depending on the insect species. In order to take this factor into account and to ensure that mortality rates were not too high in controls, we analysed the mortality rates when the mortality rate for the control reached 0.2. The insect species x treatments interaction was significant ($P < 0.05$) for both suspensions at 10^6 and 10^8 conidia.mL⁻¹. Consequently, we carried out between treatment comparisons with each insect species separately. To do so, we used a generalized linear model with a binomial distribution with the SAS GENMOD procedure, using treatment and bioassays as fixed effects. Pairwise between treatment differences were tested using a likelihood ratio test.

The second analysis focused on survival curves. We used the Kaplan-Meier estimator, a non-parametric statistic, to compare the effects of the three *Beauveria* strains on insect survival within an insect species. Survival curves were modelled using the SAS LIFETEST procedure and a log-rank test was performed to detect significant differences between treatments. Since multiple pairwise comparisons of strains increase the overall type 1 error, Sidak's correction was applied to adjust the significance thresholds in order to yield an experiment-wise P-value of 0.05. The strains' virulence was estimated by the mean survival time computed using the SAS LIFETEST procedure.

Results

Analysis of mortality rate and Kaplan-Meier survival curves

The analysis of mortality rates revealed that the effects of treatment ($F = 36.76$; $DF = 3, 81$; $P < 0.0001$), insect species ($F = 8.62$; $DF = 5, 81$; $P < 0.0001$), as well as the interaction insect species x treatment ($F = 3.55$; $DF = 17, 81$; $P < 0.0001$) were highly significant for the six fruit fly species and *G. mellonella* treated with 10^6 conidia.mL⁻¹. The analysis of mortality rates also revealed that the effects of the treatment ($F = 53.28$; $DF = 3, 25$; $P < 0.0001$), the species ($F = 45.69$; $DF = 2, 25$; $P < 0.0001$) and the insect species x treatment interaction ($F = 29.00$; $DF = 6, 25$; $P < 0.0001$) were highly significant for the species *H. marginalis*, *A.*

diaperinus and *G. mellonella* treated with 10^8 conidia.mL⁻¹. The highly significant interaction between insect species and treatment shows that the differences between treatments depend on the insect species. Consequently, to compare the treatments, the insect mortality rate and survival were analysed independently for each species. The three *Beauveria* strains used at 10^6 conidia.mL⁻¹ were pathogenic to all the fruit fly species tested and to *G. mellonella* larvae as shown by the mortality rate and Kaplan-Meier survival curves, which differed significantly from the controls, irrespective of the *Beauveria* strain used (Figs 1 and 2). The mortality rate and the Kaplan-Meier survival analysis revealed differences in virulence between the *Beauveria* strains. *B. bassiana* strains I-2960 and I-2961 were significantly more virulent than the *B. hoplocheli* strain B507 for all fruit flies tested using the Kaplan-Meier survival analysis (except for *B. zonata*) and mortality rates (Figs 1 and 2). This result is also illustrated by the mean survival times estimated from the Kaplan-Meier survival analysis (S1 Table). Strains I-2960 and I-2961 exhibited a very similar virulence pattern for the different fruit flies (Figs 1, 2 and S1 Table). The mortality rate and the Kaplan-Meier survival analysis of *G. mellonella* treated with 10^6 conidia.mL⁻¹ showed that B507 was significantly less virulent than *B. bassiana* strains (Figs 1 and 2). The Kaplan-Meier survival analysis showed that I-2961 was significantly less virulent than I-2960 at 10^6 conidia.mL⁻¹ (Fig 1).

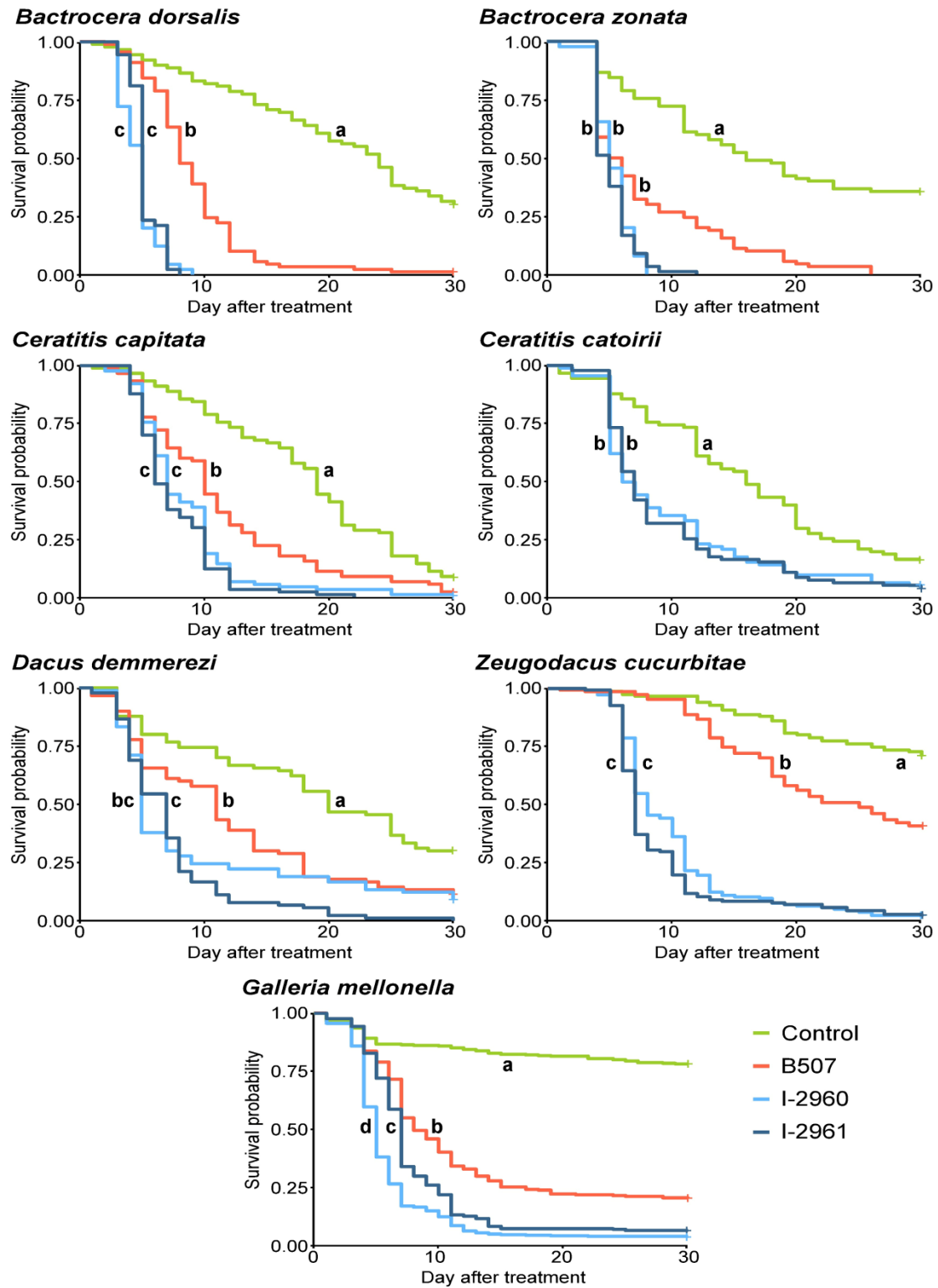


Fig 1. Kaplan-Meier survival curves for six fruit fly species and *Galleria mellonella* treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507, *B. bassiana* strains I-2960 and I-2961 using 10^6 conidia.mL⁻¹ suspensions. Different letters indicate significant differences between treatments within an insect species (log-rank test, $P < 0.05$ after Sidak’s correction). Crosses indicate censored data.

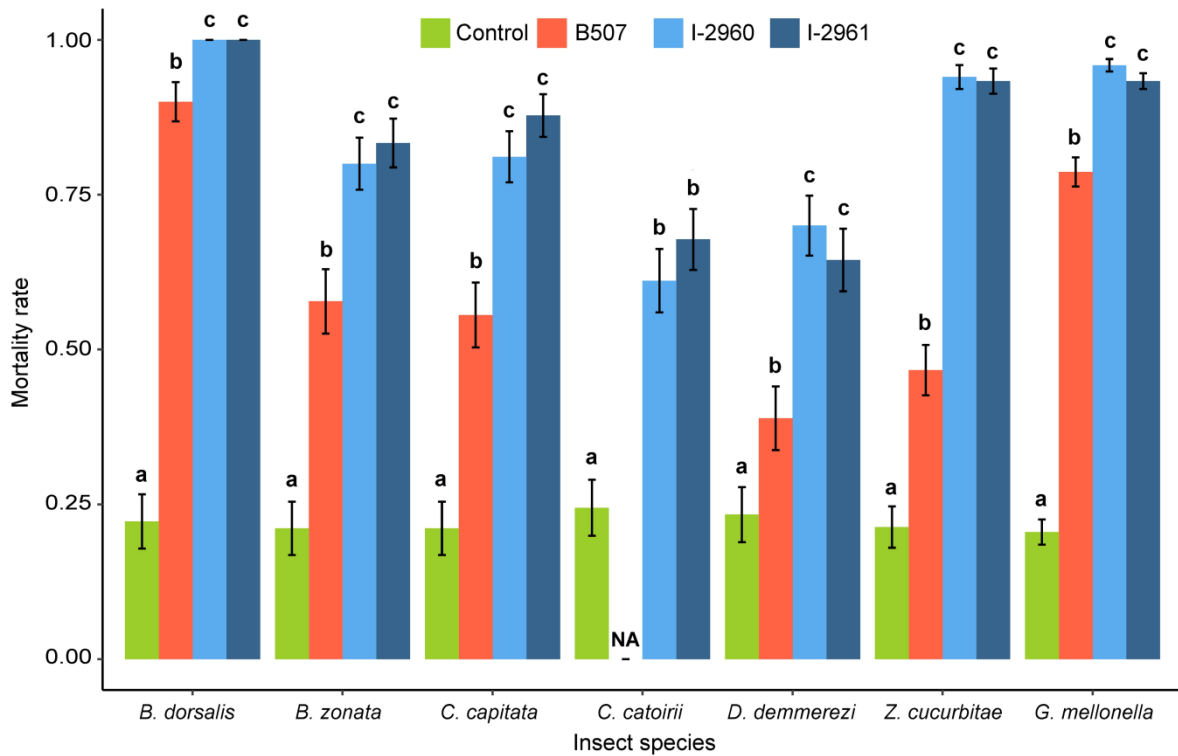


Fig 2. Mortality rate of six fruit fly species and *Galleria mellonella* treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507, *B. bassiana* strains I-2960 and I-2961 using 10^6 conidia.mL⁻¹ suspensions. Data presented are means \pm SEM, with three replicates of 30 insects for each treatment and each species. Mortality rates were calculated at the time when the mortality rate of the control reached 0.2. For each insect species, a generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using a likelihood ratio test. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

The three strains demonstrated a similar high level of virulence on *G. mellonella* at 10^8 conidia.mL⁻¹ (Figs 3, 4 and S1 Table). *B. hoplocheli* strain B507 was the only strain pathogenic to the white grub *H. marginalis* at the tested dose of 10^8 conidia.mL⁻¹. The mortality rate and the Kaplan-Meier survival curves of *H. marginalis* larvae treated with the two *B. bassiana* strains were not significantly different from the control (Figs 3 and 4). The two *B. bassiana* strains were pathogenic to *A. diaperinus* larvae, resulting in mortality rates

and Kaplan-Meier survival curves that were significantly different from the control (Figs 3 and 4). When *A. diaperinus* larvae were treated with strain B507, the mortality rate and the Kaplan-Meier survival curve were not significantly different from the control (Figs 3 and 4).

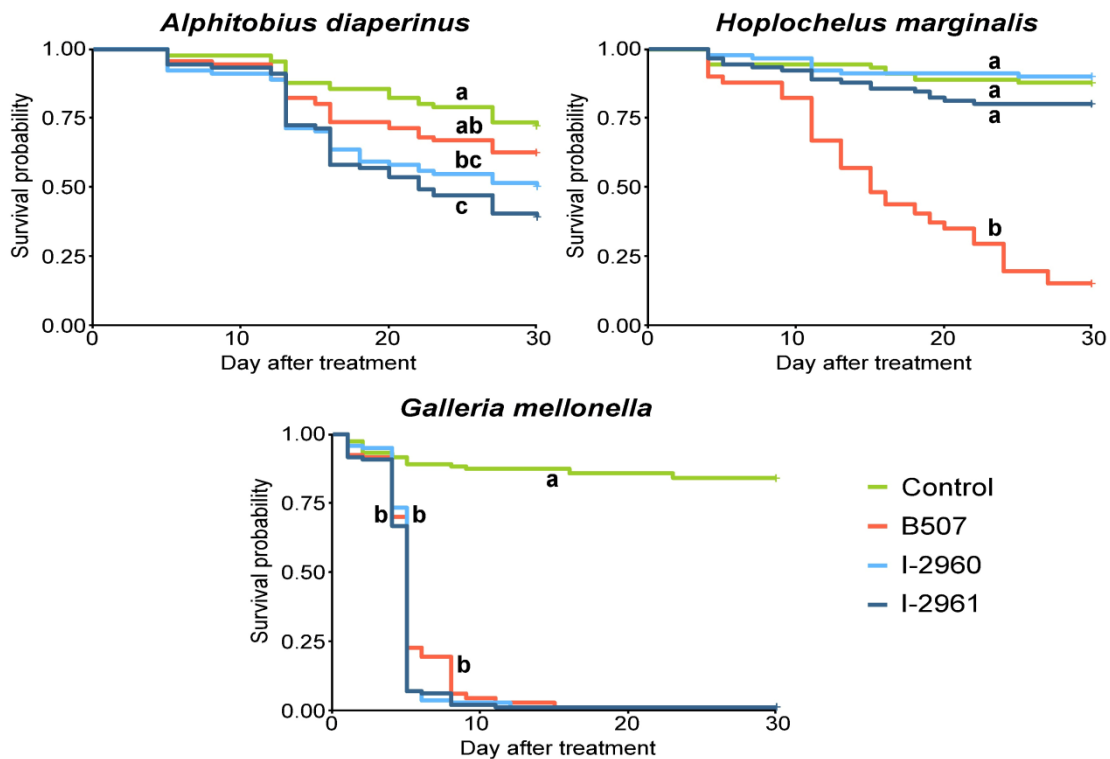


Fig 3. Kaplan-Meier survival curves for *Alphitobius diaperinus*, *Hoplochelus marginalis* and *Galleria mellonella* treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507 and *B. bassiana* strains I-2960 and I-2961 using 10^8 conidia.mL⁻¹ suspensions. Different letters indicate significant differences between treatments within an insect species (log-rank test, $P < 0.05$ after Sidak’s correction). Crosses indicate censored data.

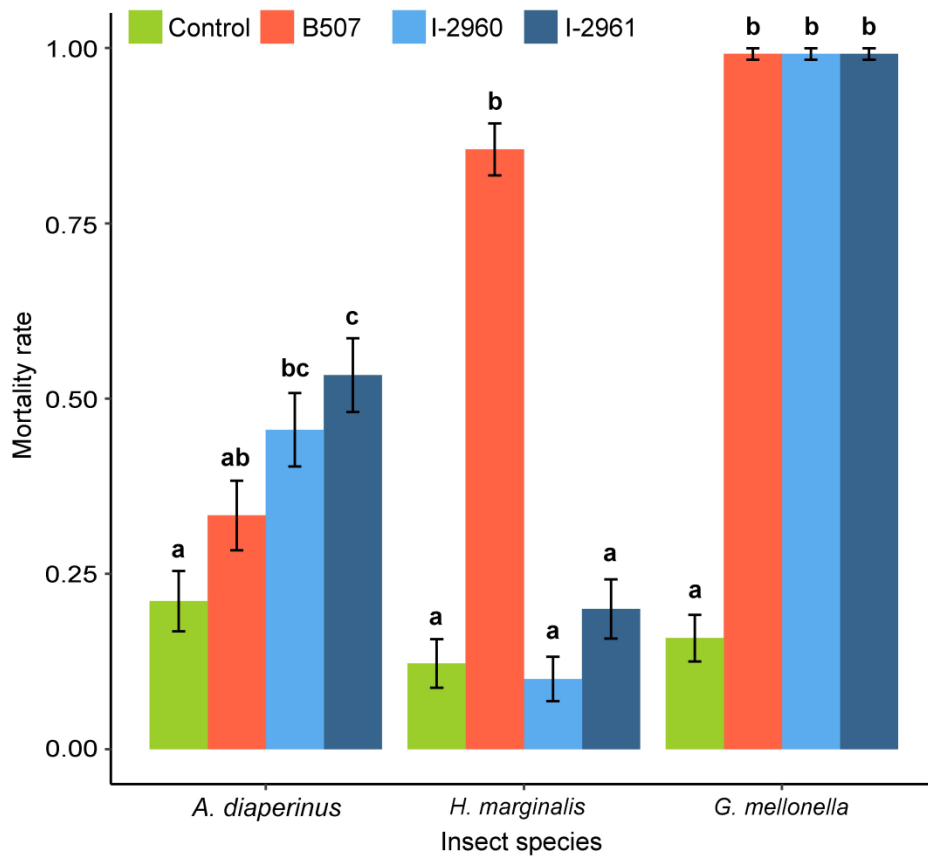


Fig 4. Mortality rate of *Alphitobius diaperinus*, *Hoplochelus marginalis* and *Galleria mellonella* treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507, *B. bassiana* strains I-2960 and I-2961 using 10^8 conidia.mL⁻¹ suspensions. Data presented are means \pm SEM, with three replicates of 30 insects for each treatment and each species. Mortality rates were calculated at the time when the mortality rate of the control reached 0.2. For each insect species, a generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using a likelihood ratio test. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

Analysis of mycosis rate

The analysis of the mycosis rate revealed that the treatments ($F = 31.60$; $DF = 2, 55$; $P < 0.0001$), and the insect species x treatment interaction ($F = 2.08$; $DF = 11, 55$; $P = 0.038$) had a significant effect for the six fruit fly species and *G. mellonella* treated with 10^6

conidia.mL⁻¹, while the insect species' effect was not significant (F = 0.66; DF = 5, 55; P = 0.66). No mycosis was recorded on the control insects. The mycosis rate induced by the *B. hoplocheli* strain B507 was significantly lower than the rates induced by the two *B. bassiana* strains for four out of five of the fruit flies tested and for *G. mellonella* (Fig 5). The *B. bassiana* strain I-2961 induced significantly higher mycosis rates than strain I-2960 for all fruit flies tested (except *B. dorsalis*) and *G. mellonella*, although the mortality rates caused by both strains were similar (Figs 1, 2 and 5). In the case of *H. marginalis*, the *B. hoplocheli* strain caused a mycosis rate of 0.27 ± 0.05 for a mortality rate of 0.86 ± 0.04 . None of the white grubs that died after treatment with strain I-2960 developed external fungal growth. For strain I-2961, the mycosis rate was 0.04 ± 0.02 , which was significantly different from the control (Chi² = 5.66; DF = 1; P = 0.0174). No mycosis was recorded on *A. diaperinus* larvae, irrespective of the *Beauveria* strain considered.

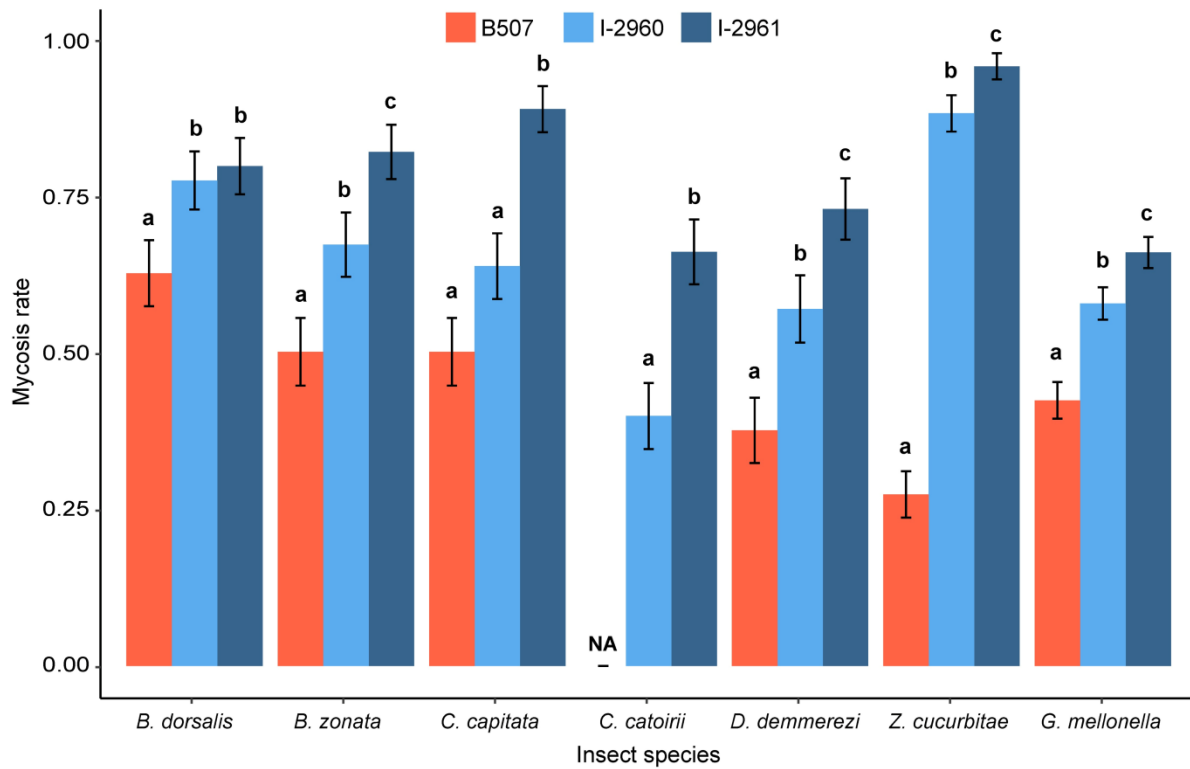


Fig 5. Mycosis rate of six fruit fly species and *Galleria mellonella* treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507 and *B. bassiana* strains I-2760 and I-2761 using 10^6 conidia.mL⁻¹ suspensions. Data presented are means \pm SEM, with three replicates of 30 insects for each treatment and each species. Mycosis rates were calculated using the percentage of cadavers showing external fungal growth out of the total number of tested insects. For each insect species, a generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using a likelihood ratio test. Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

Discussion

We demonstrated that there are significant differences in the physiological host range of the three *Beauveria* strains tested. The *B. bassiana* strains and the *B. hoplocheli* strain express different pathogenicity patterns across several insects belonging to the Coleoptera order. *B. bassiana* strains killed *A. diaperinus*, but were not pathogenic to *H. marginalis*, although

they are both beetle larval stages. These findings confirmed the results of previous studies, which showed that the strain I-2960 was not pathogenic to *H. marginalis* [24, 42]. Few studies have reported an absence of pathogenicity for *B. bassiana* strains. It is interesting to note that the work by Maurer *et al.* [43] shows that several *B. bassiana* strains that were isolated from insects other than *Ostrinia nubilalis*, were not pathogenic to this species. Strain I-2961 did not cause a significant increase in *H. marginalis* mortality rate, although it produced mycosis on a few individuals. It is possible that the fungus was able to complete its biological cycle after overcoming the insect's defences. The *B. hoplocheli* strain B507 was pathogenic to *H. marginalis*, but was not pathogenic to *A. diaperinus*. Neuvéglise *et al.* [24] also found that several *B. hoplocheli* strains were not pathogenic to *M. melolontha*, a beetle belonging to the Melolonthinae subfamily, the same subfamily as *H. marginalis*. These results confirm that, to date, *B. hoplocheli* is the only available BCA for controlling *H. marginalis* in sugarcane fields.

The *B. hoplocheli* strain, B507, was pathogenic to the tested fruit flies and to the greater wax moth, but was less virulent than the two *B. bassiana* strains. Such differences in virulence have been observed at the inter- and the intra-species level for *Beauveria*. At the inter-species level, Goble *et al.* [44] showed that *B. brongniartii* isolates were less effective against the Asian long-horned beetle than other Hypocreales fungal species, including *Beauveria asiatica*. Differences in virulence have also been reported at the intra-species level [33, 34, 45]. Differences in virulence observed among the *Beauveria* strains could be linked to conidial attachment on the cuticle, germination, as well as strategies to evade the host's immune system [46]. In addition, virulence is affected by factors including cuticle-degrading enzymes or toxic proteins, which are produced by the fungus [31, 47]. The main difference between the two *B. bassiana* strains was their potential to cause mycosis. Strain I-2961

sporulated significantly more on fruit fly cadavers than I-2960. The two *B. bassiana* strains were pathogenic to *A. diaperinus* larvae, but no mycosis was observed. Fungal development on host cadavers is a crucial parameter for BCA selection because the effectiveness of insect population control depends on the fungus' capacity to complete its biological cycle and transmission to other insects [48]. Many factors might affect the sporulation on cadavers, including temperature, humidity, conidia number and insect age [49, 50].

Using laboratory bioassays to characterize their physiological host range, we demonstrated that *B. hoplocheli* strain B507 and the two *B. bassiana* strains I-2961 and I-2960 can infect a wide range of insects belonging to three different orders. Strain I-2961 and, to a lesser extent, strain I-2960, were also known pathogens of the Coleoptera *Rhynchophorus ferrugineus* [51, 52]. Strain I-2960 showed pathogenicity toward the lepidopteran pests *Ostrinia nubilalis*, *Paysandisia archon* and *Thaumetopoea pityocampa* [53, 54]. This broad host range means that both *B. bassiana* strains have great potential to control diverse pests. As yet, the *B. hoplocheli* strain B507 has only been used to control the white grub *H. marginalis*, but we have shown that this species is not specific to Coleoptera and can infect Diptera and Lepidoptera. Hu *et al.* [55] suggested that speciation in the *Metarhizium* genus was closely related to host specificity, with an evolutionary route going from specialists to generalists, via intermediate host range species. Further pathogenicity and genomic studies are required to determine whether such a speciation pattern exists in *Beauveria*. However, as in the *Metarhizium* genus, it seems that most *Beauveria* species have a broad host range, which is probably linked to ecological fitness [55].

When these entomopathogenic fungal strains are used as BCA, their broad host range could be a concern in terms of their impact on non-target species. The ecological host range should

be considered, as it is not unusual that hosts infected in the laboratory have never been found infected in the field [4]. Hypocreales fungi, such as *Beauveria* spp., are facultative insect pathogens capable of saprophytic and endophytic life stages. Therefore, soil characteristics, abiotic factors, plant species, as well as agricultural practices can have a great impact on their persistence and activity [56-58]. There is some evidence that *B. bassiana* strains may be adapted to a habitat type rather than to a particular host [59]. When choosing a suitable BCA, it is important to study the physiological host range, combined with an assessment of the impact that environmental conditions have on the fungal strain's development. An evaluation of the persistence and distribution of the introduced biocontrol agent *B. hoplocheli* throughout Réunion is currently underway. This research will help shed light on the factors influencing its effectiveness and impact.

Acknowledgments

The authors would like to thank M. Hoarau, S. Nouhou and H. Telismart for their technical help with the laboratory work, S. Glénac, J. Payet, R. Tibère, C. Lallemand and J. Hascoat for collecting and rearing the insects. Special thanks are also owed to E. Gozé for his advice on statistical analysis.

References

1. Brodeur J. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evol Appl.* 2012;5(5):470-80.
2. Van Lenteren JC, Bale J, Bigler F, Hokkanen HMT, Loomans AJM. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annu Rev Entomol.* 2006;51:609-34.
3. Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, et al. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* 2012;30(5):250-8.
4. Hajek AE, Goettel MS. Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms. In: Lacey LA, Kaya HK, editors. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2007. p. 816-33.
5. Fargues J, Remaudiere G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia.* 1977;62(1):31-7.
6. Goettel M, Poprawski T, Vandenberg J, Li Z, Roberts D. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey L, Davidson E, editors. *Safety of microbial insecticides:* CRC Press; 1990. p. 209-29.
7. Van Driesche R, Hoddle M. Non-target effects of insect biocontrol agents and trends in host specificity since 1985. *CAB Reviews.* 2016;11(44):1-66.
8. Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol.* 2005;88(1):1-7.
9. Onstad D, Fuxa J, Humber R, Oestergaard J, Shapiro-Ilan D, Gouli V, et al. An abridged glossary of terms used in invertebrate pathology 2006. Available from: <http://www.sipweb.org/resources/glossary.html>.
10. Inglis GD, Enkerli J, Goettel MS. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in invertebrate pathology.* 2nd ed. London, UK: Academic Press; 2012. p. 189-253.

11. Faria MRd, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control*. 2007;43(3):237-56.
12. Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE, Steinkraus DC. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, UK: CAB International; 2001. p. 71-153.
13. Jensen AB, Thomsen L, Eilenberg J. Value of host range, morphological, and genetic characteristics within the *Entomophthora muscae* species complex. *Mycol Res*. 2006;110(8):941-50.
14. Gryganskyi A, Humber R, Smith M, Hodge K, Huang B, Voigt K, et al. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia*. 2013;30:94–105.
15. Hajek AE, Gardescu S, Delalibera Jr. I. Classical biological control of insects and mites: a worldwide catalogue of pathogen and nematode introductions. Morgantown, WV: FHTET, USDA Forest Service; 2016. 57 p.
16. Feng M, Poprawski T, Khachatourians GG. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol*. 1994;4(1):3-34.
17. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(5-6):413-23.
18. Vestergaard S, Cherry A, Keller S, Goettel M. Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen HMT, Hajek AE, editors. *Environmental impacts of microbial insecticides: need and methods for risk assessment*. Progress in Biological Control. Dordrecht, Netherlands: Springer; 2003. p. 35-62.

19. Imoulan A, Hussain M, Kirk PM, El Meziane A, Yao Y-J. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *J Asia Pac Entomol.* 2017;20:1204-12.
20. Leatherdale D. The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain. *BioControl.* 1970;15(4):419-35.
21. Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia.* 2011;103(5):1055-73.
22. Robène-Soustrade I, Jouen E, Pastou D, Payet-Hoareau M, Goble TA, Linderme D, et al. Description and phylogenetic placement of *Beauveria hoplocheli* sp. nov. used in the biological control of the sugarcane white grub, *Hoplochelus marginalis*, in Reunion Island. *Mycologia.* 2015;107(6):1221-32.
23. Vercambre B, Goebel O, Riba G, Marchal M, Neuvéglise C, Ferron P. Success in biological control of a soil pest, *Hoplochelus marginalis*, in Reunion island: choice of a suitable fungus. *Vith International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*; 1993 Dec 7-9; Montpellier, France: Society for Invertebrate Pathology; 1994. p. 283-8.
24. Neuvéglise C, Brygoo Y, Riba G. 28s rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. *Mol Ecol.* 1997;6(4):373-81.
25. Bricca ES, Nibouche S, Delatte H, Normand F, Amouroux P. Test of the pathogenicity of two commercial *Beauveria* strains on third-instar larvae of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt)(Diptera: Cecidomyiidae). *Fruits.* 2014;69(3):189-94.
26. Quesada-Moraga E, Vey A. Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains

and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Sci Technol.* 2003;13(3):323-40.

27. Quesada-Moraga E, Landa B, Muñoz-Ledesma J, Jiménez-Díaz R, Santiago-Alvarez C. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia.* 2006;161(5):323-9.

28. Valero-Jiménez CA, Debets AJ, van Kan JA, Schoustra SE, Takken W, Zwaan BJ, et al. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malar J.* 2014;13(1):1-8.

29. Carneiro AA, Gomes EA, Guimarães CT, Fernandes FT, Carneiro NP, Cruz I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. *Pesq Agropec Bras.* 2008;43(4):513-20.

30. Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Sci Technol.* 2006;16(5):525-34.

31. Zare M, Talaei-Hassanloui R, Fotouhifar K-B. Relatedness of proteolytic potency and virulence in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates. *J Crop Prot.* 2014;3(4):425-34.

32. Todorova S, Côté J-C, Martel P, Coderre D. Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bio-assays of *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) and *Coleomegilla maculata lengi* (Col.: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga.* 1994;39(2):159-69.

33. Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(3):186-99.

34. Uma Devi K, Padmavathi J, Uma Maheswara Rao C, Khan AAP, Mohan MC. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Sci Technol*. 2008;18(10):975-89.
35. Mze Hassani I, Raveloson-Ravaomanarivo LH, Delatte H, Chiroleu F, Allibert A, Nouhou S, et al. Invasion by *Bactrocera dorsalis* and niche partitioning among tephritid species in Comoros. *Bull Entomol Res*. 2016;106(6):749-58.
36. Duyck PF, Quilici S. Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bull Entomol Res*. 2002;92(6):461-9.
37. Meyling NV. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual. University of Copenhagen; 2007.
38. Ekesi S, Maniania N, Lux S. Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci Technol*. 2002;12(1):7-17.
39. Quesada-Moraga E, Ruiz-García A, Santiago-Álvarez C. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol*. 2006;99(6):1955-66.
40. De la Rosa W, Lopez F, Liedo P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *J Econ Entomol*. 2002;95(1):36-43.
41. SAS Institute. SAS/STAT. 9.3 ed. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.; 2010.
42. Neuvéglise C, Brygoo Y, Vercambre B, Riba G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycol Res*. 1994;98(3):322-8.

43. Maurer P, Couteaudier Y, Girard P, Bridge P, Riba G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol Res.* 1997;101(2):159-64.
44. Goble TA, Rehner SA, Long SJ, Gardescu S, Hajek AE. Comparing virulence of North American *Beauveria brongniartii* and commercial pathogenic fungi against Asian longhorned beetles. *Biol Control.* 2014;72:91-7.
45. Keller S, Schweizer C, Shah P. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol.* 1999;9(3):441-6.
46. Lu H-L, St. Leger R. Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Adv Genet.* 2016;94:251-85.
47. Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol.* 2010;105(3):270-8.
48. Hajek AE, St. Leger RJ. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu Rev Entomol.* 1994;39(1):293-322.
49. Fargues J, Luz C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Sci Technol.* 1998;8(3):323-34.
50. Tefera T, Pringle K. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Invertebr Pathol.* 2003;84(2):90-5.
51. European Food Safety Authority. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Beauveria bassiana* strain NPP111B005. *EFSA Journal.* 2015;13(10):4264.
52. European Food Safety Authority. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Beauveria bassiana* strain 147. *EFSA Journal.* 2015;13(10):4261.

53. Besse S, Bonhomme A, Panchaud K. Preventive and curative efficacy of Ostrinil®, a *Beauveria bassiana* spores based microgranule formulation, against the Castniid palm borer *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880). 3rd Annual Biocontrol Industry Meeting; 2008 Oct 20-21; Lucerne, Switzerland.
54. Bonnet C, Martin J, Mazet R, Correard M, Besse S. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv) Vuillemin: an entomopathogen to reduce the expansion of the pine processionary plants transported by container. 3e Conférence sur l'entretien des Zones Non Agricoles; 2013 Oct 15-17; Toulouse, France: Association Française de Protection des Plantes (AFPP); 2013. p. 209-13. French.
55. Hu X, Xiao G, Zheng P, Shang Y, Su Y, Zhang X, et al. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(47):16796-801.
56. Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycol Res. 2007;111(8):947-66.
57. Meyling NV, Lubeck M, Buckley EP, Eilenberg J, Rehner SA. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. Mol Ecol. 2009;18(6):1282-93.
58. Moonjely S, Barelli L, Bidochka MJ. Insect pathogenic fungi as endophytes. Adv Genet. 2016;94:107-35.
59. Bidochka MJ, Menzies FV, Kamp AM. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. Arch Microbiol. 2002;178(6):531-7.

Supporting information

S1 Table. Mean survival time in days of insects treated with *Beauveria hoplocheli* strain B507 and *Beauveria bassiana* strains I-2960 and I-2961 at 10⁶ conidia.mL⁻¹ or 10⁸ conidia.mL⁻¹.

Kaplan-Meier analysis was used to estimate the mean survival time for each *Beauveria* strain in each bioassay (three replicates of 30 insects).

Insect	Mean survival time (means ± standard error)			
	Control	B507	I-2960	I-2961
10⁶ conidia.mL⁻¹				
<i>Bactrocera dorsalis</i>	21.0 ± 1.0	9.1 ± 0.5	4.7 ± 0.2	5.2 ± 0.1
<i>Bactrocera zonata</i>	17.9 ± 1.1	8.1 ± 0.6	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.2
<i>Ceratitis capitata</i>	18.2 ± 0.8	11.4 ± 0.7	8.5 ± 0.5	7.6 ± 0.4
<i>Ceratitis catoirii</i>	16.6 ± 0.9	NA	10.1 ± 0.8	9.8 ± 0.7
<i>Dacus demmerezi</i>	19.0 ± 1.1	12.6 ± 0.9	9.6 ± 1.0	7.3 ± 0.5
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	26.5 ± 0.6	22.2 ± 0.7	9.9 ± 0.4	8.9 ± 0.4
<i>Galleria mellonella</i>	25.4 ± 0.5	12.8 ± 0.6	6.5 ± 0.3	8.7 ± 0.3
10⁸ conidia.mL⁻¹				
<i>Alphitobius diaperinus</i>	26.7 ± 0.7	24.5 ± 0.9	22.3 ± 0.9	21.5 ± 0.9
<i>Hoplochelus marginalis</i>	27.8 ± 0.7	16.9 ± 0.9	28.1 ± 0.7	26.4 ± 0.8
<i>Galleria mellonella</i>	26.3 ± 0.8	5.4 ± 0.3	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3

Kaplan-Meier analysis was used to estimate the mean survival time for each *Beauveria* strains in each bioassay (three replicates of 30 insects).

Chapitre 2 : Evaluation de la capacité de transmission horizontale des spores d'une souche de *Beauveria bassiana* des mâles aux femelles de la mouche du melon lors de l'accouplement

Contexte

La famille des Tephritidae (Diptera) compte environ 4000 espèces, communément appelées « mouches des fruits », réparties en 500 genres (White & Elson-Harris, 1992). Près de 250 espèces sont considérées comme des ravageurs d'importance économique. Elles sont largement distribuées dans le monde dans des régions tempérées, subtropicales ou tropicales (Christenson & Foote, 1960). A La Réunion, on compte neuf espèces de Tephritidae considérées comme des ravageurs des cultures maraîchères et fruitières, dont la mouche du melon *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Charlery de la Masselière *et al.*, 2017; De Meyer *et al.*, 2015). Les mouches des fruits sont difficiles à atteindre avec un traitement insecticide, car les différents stades du cycle biologique sont localisés dans différents micro-habitats : phase larvaire dans les fruits, pupaison dans le sol et adultes aériens. Il est donc indispensable de mettre au point une méthode d'application et de dissémination de l'insecticide de synthèse ou biologique adaptée. Les méthodes de contrôle des populations de *Z. cucurbitae* ont reposé pendant longtemps majoritairement sur la lutte chimique réalisée durant la phase de sensibilité des fruits aux attaques (Roessler, 1989). Cette protection montre cependant ses limites notamment par ses conséquences sanitaires, environnementales et économiques. La lutte biologique basée sur l'utilisation de champignons entomopathogènes est une alternative à la lutte chimique contre les Tephritidae. Certaines souches des champignons entomopathogènes *B. bassiana* et *M. anisopliae* se révèlent en effet pathogènes de plusieurs espèces de Tephritidae (De la Rosa *et al.*, 2002; Dimbi *et al.*, 2003; Ekesi *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006b). La stratégie d'auto-dissémination de ces champignons pour contrôler les mouches des fruits a été développée (Dimbi *et al.*, 2003; San Andrés *et al.*, 2014) et évaluée sur le terrain (Ekesi *et al.*, 2007; Navarro-Llopis *et al.*, 2015; Toledo *et al.*, 2017). Cette stratégie permet de limiter les risques sur les espèces non cibles en attirant spécifiquement les ravageurs visés et en réduisant la quantité d'inoculum libéré au champ (Vega *et al.*, 2007). Pour un certain nombre d'espèces de Tephritidae, telles que *Z. cucurbitae*, on ne dispose pas d'attractifs efficaces sur les femelles, qui sont pourtant responsables des dégâts en pondant un

grand nombre d'œufs parfois dans plusieurs hôtes. L'utilisation de mouches mâles comme vecteurs pour contaminer les femelles est une piste prometteuse, qui dépend cependant de la transmission des spores de champignons des mâles aux femelles lors de l'accouplement (Dimbi *et al.*, 2003; Navarro-Llopis *et al.*, 2015; Quesada-Moraga *et al.*, 2008; San Andrés *et al.*, 2014; Sookar *et al.*, 2014).

Approche

Ce chapitre s'inclut dans un projet dont l'objectif est la mise au point d'une méthode de lutte biologique contre la mouche du melon à La Réunion basée sur l'auto-dissémination de champignon entomopathogène. Cette méthode doit permettre d'attirer les mâles de Tephritidae et de les contaminer par des spores de *Beauveria*, ces mâles devenant alors disséminateurs du champignon pour contaminer les femelles par accouplement. L'objectif de ce chapitre était d'évaluer la capacité de transmission horizontale des spores d'une souche commerciale de *B. bassiana* des mâles aux femelles de la mouche du melon, *Zeugodacus cucurbitae*, lors de l'accouplement. La souche I-2961 a été choisie pour cette étude car nous avons montré sa forte virulence contre *Z. cucurbitae* (voir Chapitre 1). Nous avons réalisé des tests de transmission de conidies au laboratoire en couplant un mâle contaminé et une femelle vierge et en comparant différents temps d'isolement des mouches mâles entre leur contamination et la mise en couple. L'originalité du dispositif expérimental permet :

i/ de prendre en compte la contamination de l'enceinte dite "d'accouplement" dans laquelle un mâle et une femelle sont rapprochés, un biais dont aucune étude antérieure ne tient compte. Pour cela, la survie d'une femelle "saine" placée dans l'enceinte d'accouplement durant 24h a été suivie.

ii/ d'empêcher les contaminations croisées entre individus après la phase d'accouplement, les couples étant isolés et le suivi des individus étant réalisé dans des dispositifs d'élevage individuels.

Résultats et discussion

Quand les mâles et les femelles sont mis en situation d'accouplement une heure après contamination du mâle, nous avons démontré que la transmission horizontale de conidies de la souche *B. bassiana* I-2961 aux femelles de *Z. cucurbitae* permettait de réduire significativement la longévité des mouches femelles, leur temps de survie étant réduit de moitié. Le dispositif expérimental a permis de démontrer que la mortalité des femelles était significativement plus importante lorsqu'il y avait accouplement, mais qu'une partie de la mortalité observée était aussi significativement due à i/ des transferts de spores entre le mâle et la femelle sans qu'il y ait accouplement et ii/ une contamination de l'environnement d'accouplement par des conidies du champignon libérées par le mâle contaminé. Nous avons aussi démontré que la quantité de spores disponibles pour transmission sur les mâles était trop faible 24 h après leur contamination pour affecter la longévité des femelles.

Ces résultats confirment le potentiel de l'utilisation de champignons entomopathogènes dans des stratégies d'auto-dissémination. La mise en œuvre d'une telle stratégie nécessitera encore plusieurs travaux, notamment la mise au point d'un dispositif d'auto-inoculation contenant une formulation adéquate du champignon, avant de pouvoir réaliser des tests d'efficacité au champ.

Article 2 : manuscrit en préparation

Rohrlich, C., Merle, I., Venard, J., Verger, D., Besse, S., Nibouche, S., Costet, L. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in melon flies *Zeugodacus cucurbitae* during mating.

**Article 2: Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus
Beauveria bassiana in melon flies *Zeugodacus cucurbitae* during mating**

Rohrlich Clara^{1,2,3}, Verger Damien¹, Venard Julie¹, Merle Isabelle¹, Besse Samantha⁴, Nibouche Samuel¹, Costet Laurent¹

¹ CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

² Arysta LifeScience Group, BETEL Réunion, F-97470 Saint-Benoît, La Réunion, France

³ Université de La Réunion, F- 97400 Saint-Denis, La Réunion, France

⁴ Arysta LifeScience Group, NPP, F-64000 Pau, France

Abstract

Entomopathogenic fungi have shown good potential for biocontrol of Tephritidae fruit flies. We carried out laboratory assays to investigate whether horizontal transmission of *Beauveria* conidia from male to female *Z. cucurbitae* during mating was efficient to kill female flies. Contamination by *B. bassiana* killed 100 % of male flies with development of mycosis within seven days. Male flies still retained $1.3 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$ conidia one hour after their contamination and were able to transmit enough conidia to females to significantly reduce their survival time. This transmission occurred whether flies mated or not, but it increased when mating took place. Mated females had a mean survival time shortened by 14 days compared with control flies and seven days compared with unmated females that were in contact with contaminated males. Conidia quantity and availability on males rapidly decreased over time and no horizontal transmission occurred 24 h after male contamination. We also detected an experimental bias caused by the contamination of the mating cages by contaminated males. This ‘passive’ contamination caused a significant mortality increase in females introduced alone in the contaminated cages. This unwanted contamination was never taken in account by previously horizontal transmission studies and makes therefore their interpretation cautious. Future field studies are required to confirm the ability of auto-disseminated *B. bassiana* to control *Z. cucurbitae* populations.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Zeugodacus cucurbitae*, horizontal transmission, mating, auto-dissemination

Introduction

The melon fly *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) (= *Bactrocera cucurbitae*) is a major agricultural pest in tropical areas (De Meyer *et al.*, 2015). This fruit fly originated from Central Asia and is now widely distributed in many countries in Asia, Oceania, Africa as well as several islands in the western Indian Ocean like Mauritius and Reunion (Virgilio *et al.*, 2010). It attacks more than 136 plant species belonging largely to the Cucurbitaceae family (McQuate *et al.*, 2017). *Z. cucurbitae* is among the main pests for several crops, including cucumber (*Cucumis sativus* L.) or zucchini (*Cucurbita pepo* L.), where losses up to 100 % are reported (Ryckewaert *et al.*, 2010). The damage-causing maggots develop inside the fruits and pupae are in the soil, so till today the control of this pest relies largely on insecticide targeting adults (Dhillon *et al.*, 2005), the only easy accessible stage. Strategies for control of *Z. cucurbitae* are being developed to reduce resistance, environment and health risks associated with the use of these chemicals including prophylactic methods, consisting in collecting and destroying the infested fruits (Dhillon *et al.*, 2005), bait sprays (Prokopy *et al.*, 2003), male annihilation technique (Steiner *et al.*, 1965), sterile insect technique (SIT) (Yosiaki *et al.*, 2003), as well as biological control methods based on releases of parasitoids (Bautista *et al.*, 2004). Biological control with entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Cordycipitaceae) could be an alternative to chemical control of *Z. cucurbitae*. Laboratories and field studies have demonstrated the pathogenicity and effectiveness of this fungus against several Tephritidae species (De la Rosa *et al.*, 2002; Dimbi *et al.*, 2003; Ekesi *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Rohrlisch *et al.*, 2018). After selecting a highly pathogenic strain of the fungus, a suitable method of application must be developed to ensure a good reach of the insect target and an efficient control of the population. Auto-dissemination strategy with entomopathogenic fungi for the control of Tephritidae flies has been developed (Dimbi *et al.*, 2003; San Andrés *et al.*, 2014) and evaluated with success in the field using *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin to protect mango from *Ceratitis cosyra* (Walter) in Kenya (Ekesi *et al.*, 2007) and citrus from *C. capitata* (Wiedemann) in Spain (Navarro-Llopis *et al.*, 2015), and using *B. bassiana* to protect coffee from *C. capitata* in Guatemala (Toledo *et al.*, 2017).

This strategy involves attracting adult insects into an auto-inoculation device where they are contaminated with conidia of an entomopathogenic fungus, then get out of the device to disseminate the fungus in the population. The advantages of this strategy include i) a specific

targeting of the pest as specific attractants can be used, ii) the release of a limited amount of inoculum, iii) the protection of the conidia from solar radiations and rain inside the device, and iv) the dissemination of the fungus via the infected pest can reach insect in sites inaccessible with other application methods (Vega *et al.*, 2007). For an efficient control of *Z. cucurbitae* below the economic injury level, it is essential to interrupt the biological cycle of the fly by killing the females that lay eggs in the fruits.

One of the challenges is to target the females who lay their eggs in the fruits and are therefore responsible for the damages and for the next generation (Jang & Light, 1996). Current *Z. cucurbitae* and other fruit fly female attractants are mainly limited to food lures that often have low efficiency, are difficult to handle and attract non-target species (Jang *et al.*, 2017; Jang & Light, 1996; Manrakhan, 2006). On the other hand, potent male lures are available such as raspberry ketone and its derivative cue-lure for *Z. cucurbitae* (Tan *et al.*, 2014). One strategy is to attract male flies in the auto-inoculation device with a specific lure and use them as vector to transmit the fungal pathogen to the females. Horizontal transmission of conidia from males to females *Z. cucurbitae* is most likely to occur during mating since it begins at dusk and terminates at dawn, usually lasting more than 10 h during which genital contact is maintained (Suzuki & Koyama, 1980; Yamagishi & Tsubaki, 1990).

Horizontal transmission of *B. bassiana* or *Metarhizium anisopliae* s.l. from male to female flies has been evaluated in several Tephritidae species (Dimbi *et al.*, 2013; Quesada-Moraga *et al.*, 2008; Sookar *et al.*, 2014; Sookar *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2007). But in these experiments, matings are rarely monitored and/or flies are not isolated, which can cause cross contaminations and doesn't allow concluding that conidia transmission occurred during mating.

We investigated whether horizontal transmission of *Beauveria* conidia from male to female *Z. cucurbitae* during mating actually occurs and whether this transmission has an effect on female survival.

Materials and Methods

1. *Beauveria* strain

B. bassiana strain I-2961 was obtained from Arysta LifeScience. This strain is pathogenic toward *Z. cucurbitae* adults (Rohrlich *et al.*, 2018). Conidia formulated on montmorillonite microgranules were kept at -20°C after arrival and taken out at room temperature one hour before each experiment. Conidia quantity and viability in the formulated product was

controlled by suspending conidia in 10 mL of solution of 0.05% TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and plating 100 µL of the conidia suspension onto PDA. Plates were incubated at 25°C for 5 days, and then the colony forming units (CFU) were counted.

2. Insects

Fruit fly populations of *Z. cucurbitae* were reared on zucchini in the laboratory for 64 generations as described by Duyck and Quilici (2002). Flies were separated by sex three days after emergence to ensure they remained unmated before the experiments, as the first mating can occur from four days after emergence (Suzuki & Koyama, 1980). Flies used for horizontal transmission experiments were 16 ± 3 days old and sexually mature.

3. Quantification of conidia uptake by male flies

An experiment was carried out to estimate the number of *B. bassiana* conidia picked up by a single male fly during contamination and its evolution over time. Sixty male flies were anesthetized with CO₂ and placed by groups of five in a Petri dish containing 5 g of the formulated *B. bassiana* conidia. Flies were gently shaken for five seconds then transferred in a 30 x 30 x 60 cm Plexiglas cage. Ten flies were immediately collected from the cage, anesthetized for 5 min at -20°C and placed individually in a 2 mL Eppendorf tube containing 1 mL of 0.05% TWEEN® 80 solution. The tube was vortexed for three min to dislodge conidia from the insect. The number of conidia was estimated by plating 100 µL of the suspension onto PDA after serial dilutions, using two or three plates per dilution. The process was repeated 2, 4, 8 and 24 h after contamination. Colonies (CFU) were counted after five or six days of incubation at 25°C in the dark. For each fly, only one dilution was chosen to count the CFU, preferably the dilution yielding 20 to 300 colonies per plate. A second replication of the experiment was carried out, with an additional measure 1 h after contamination.

4. Horizontal spore transmission experiments

a. One hour after male contamination and mating in large boxes

Twenty-five male flies were contaminated as described above. Fifteen control male flies were exposed to montmorillonite microgranules without conidia and transferred to a different cage. Male flies remained isolated for one hour to mimic time spend to find a female. During this isolation time, the flies had access to food (sugar and yeast) and water. Five flies were used

for conidia quantification, following the protocol presented in the previous section. After the isolation time, each of the 20 remaining males was paired with one unmated female in a large 30 x 30 x 30 cm mesh cage. Since mating in *Z. cucurbitae* occurs at dusk and can last up to 10 h (Suzuki & Koyama, 1980), flies were paired between 15h30 and 16h and held together through the night for 18 h. Flies were observed every 15 min between 16h30 and 18h30 to record mating. After 18 h five females were sampled for conidia quantification and the other flies were placed separately in 125 mL plastic containers with food and water. Then, one “clean” female was placed in each mating cage for 24 h to control a possible contamination by conidia left in the cage by the contaminated male. After 24 h, five of these female flies were sampled for conidia quantification and the other ones were placed in a clean 125 mL plastic container. Flies were fed three times a week with a liquid diet containing a 10:1 mix of sucrose and yeast enzymatic hydrolysate (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Insect mortality was recorded daily for 30 days. Dead insects were surface-sterilized in 70% alcohol for five seconds, rinsed in sterile distilled water for five seconds and placed on a damp sterilised filter paper moistened with 200 µL sterile distilled water in a 55 mm vented Petri dish to stimulate external fungal growth. Development of mycosis was checked 10 days after death. The whole experiment was repeated six times.

b. Twenty-four hours after male contamination and mating in small boxes

To evaluate the capacity of male flies to transmit conidia after a longer isolation time, we carried out the same experiment but isolating the males during 24 h after contamination. We used 125 mL plastic containers as mating cage. We used 30 couples for each modality (*Beauveria* and uncontaminated control) and 30 females to control the containers contamination. The whole experiment was repeated three times.

5. Data analysis

Horizontal transmission experiments compared two treatments for male flies: contaminated and control; and four treatments for female flies: females that mated with contaminated males, females in contact with contaminated males without mating, females placed alone during 24 h in the mating cage, control (females placed with untreated males). We used Kaplan-Meier survival analysis to study the effects of *Beauveria* contamination and transmission on flies' survival. Survival curves were modelled using the SAS LIFETEST procedure (SAS Institute, 2010) and a log-rank test was performed to detect significant differences between treatments.

The Sidak's correction was used to adjust the P-value for multiple pairwise comparisons. The mean survival time was calculated. We also analysed fly mortality rate after 30 days, as well as mycosis and mating rates using generalized linear models with SAS GENMOD procedure. Mycosis rates were calculated as the percentage of cadavers showing external fungal growth among the number of dead individuals. The models included treatments and replication as fixed factors. The significance of pairwise treatment differences were tested using a likelihood ratio test.

The experiment design used to study the evolution of conidia quantity on male flies over time compared five or six times after contamination with ten individual flies and repeated measures (several plates for CFU counting) for each fly. This design resulted in an incomplete block design, where each of the two experiment repetitions was considered as an incomplete block. The analyses were carried out with a generalized linear mixed model using a negative binomial distribution and a log link function with SAS GLIMMIX procedure (SAS Institute, 2010). The model included time as fixed factor, and experiments and individual flies as random factors.

Results

1. Quantification of conidia uptake by male flies: conidia availability decrease over time

Viable conidia quantity in the formulated product was $1.51 \times 10^9 \pm 1.81 \times 10^8$ CFU g⁻¹. The number of conidia recovered from a single male fly immediately after contamination with the *B. bassiana* product was $2.2 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$. The number of conidia on a male fly decreased over time after contamination ($F_{5; 109} = 26.6$; $P < 0.0001$). It was divided by two after 1 h and by 24 after 24 h (Table 1).

Table 1. Number of conidia recovered from individual male *Zeugodacus cucurbitae* after contamination with formulated *Beauveria bassiana*.

Time after contamination (h)	Number of conidia per fly (mean \pm SEM)	
0	$2.2 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$	a
1	$1.3 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$	b
2	$4.8 \times 10^5 \pm 8.8 \times 10^4$	c
4	$3.8 \times 10^5 \pm 5.3 \times 10^4$	cd
8	$2.8 \times 10^5 \pm 7.8 \times 10^4$	d
24	$9.1 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$	e

Different letters indicate significantly different means (GLMM, $P < 0.05$).

2. Horizontal spore transmission experiments

a. Male survival and mating

Viable conidia quantity in the formulated product was $1.68 \times 10^8 \pm 5.28 \times 10^7$ CFU g⁻¹ for transmission tests where male were isolated for one hour after contamination and was $1.51 \times 10^9 \pm 1.81 \times 10^8$ CFU g⁻¹ for transmission tests where male were isolated for 24 hours. One hour after contamination, male flies used for the transmission bioassays carried between 1.5×10^6 and 1.0×10^5 conidia per fly, with a mean of $6.6 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^4$ conidia. Twenty-four hours after contamination, male flies used for the transmission bioassays carried between 2.2×10^5 and 1.6×10^3 conidia per fly, with a mean of $2.4 \times 10^4 \pm 8.3 \times 10^3$ conidia. The male flies contaminated with *B. bassiana* all died and developed mycosis in every bioassay. Their survival curve was significantly different from the control, either in experiments in big cages ($\chi^2 = 189.93$, DF = 1, $P < 0.0001$) or in small boxes ($\chi^2 = 152.79$, DF = 1, $P < 0.0001$). In the experiments in mesh cages, their mean survival time was 6.2 ± 0.04 days, and in small boxes it was 5.5 ± 0.3 days while control male flies' mean survival times exceeded 24 days.

Male contamination had no significant effect on their mating success, either after they were isolated during 1 h ($\chi^2 = 2.73$, DF = 1, $P = 0.10$) or during 24 h ($\chi^2 = 0.32$, DF = 1, $P = 0.57$). The mean mating rate was 0.88 ± 0.02 in big boxes (1h) and 0.66 ± 0.04 in small boxes (24h).

b. Spore transmission one hour after male contamination

The mating had no effect on control female flies survival curves ($\chi^2 = 0.06$, DF = 1, P = 0.80). The Kaplan-Meier survival analysis and female mortality rates after 30 days revealed that the treatment had a significant effect on female survival curves ($\chi^2 = 146.9$, DF = 3, P < 0.0001) and mortality rates ($\chi^2 = 122.7$, DF = 3, P < 0.0001). Survival curves and mortality rates of mated and unmated females that were in contact with contaminated males were significantly different from the control (Figure 1, Table 2). Survival curves and mortality rates of mated female were significantly different from unmated females that were in contact with contaminated males (Figure 1, Table 2). Mated females had a mean survival time shorten by 14 days compared with control flies and seven days compared with unmated females that were in contact with contaminated males (Table 2). It means that there was horizontal transmission of *B. bassiana* conidia from males to females and that this transmission was increased when mating occurred. The survival curve of clean females placed into the mating cages after mating was not significantly different from of the control (Figure 1), but when analysing the mortality rates the two modality were significantly different (Table 2). The clean females placed in the mating box after mating were contaminated by *B. bassiana* conidia release by the male in the box.

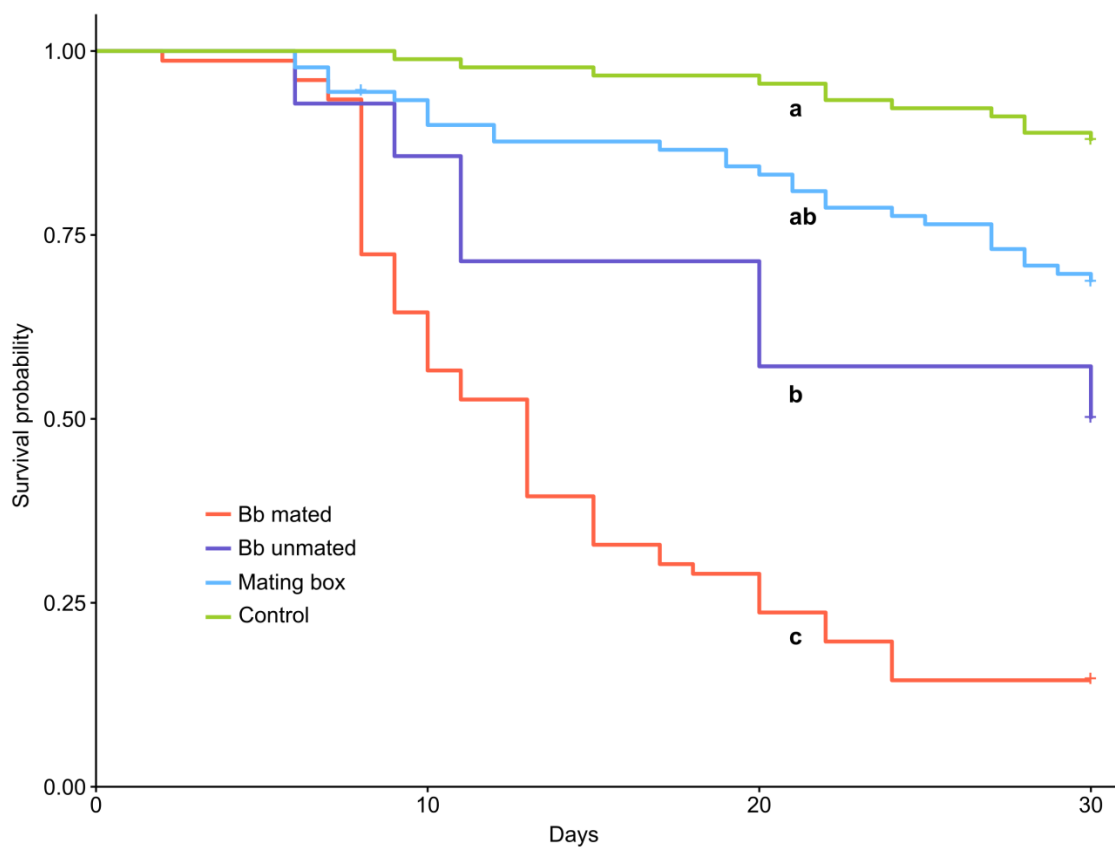


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves for female *Zeugodacus cucurbitae*. Male flies were contaminated with *Beauveria bassiana* conidia and isolated during one hour. Bb mated: females that mated with contaminated males; Bb unmated: females in contact with contaminated males without mating; Mating box: females placed alone during 24 h in the mating box; Control: females in contact with uncontaminated males. Different letters indicate significantly different curves (log-rank test, $P < 0.05$ after Sidak's correction). Crosses indicate censored data.

Table 2. Female *Zeugodacus cucurbitae* mortality and survival.

Male flies were contaminated with *Beauveria bassiana* conidia and isolated during one hour

Treatment	Mortality rate after 30 days (mean ± SEM)		Mean survival time (mean ± SEM) in days
	Total	With mycosis	
Bb Mated	0.86 ± 0.04 c	0.94 ± 0.03 c'	14.9 ± 0.9
Unmated	0.50 ± 0.13 b	0.86 ± 0.13 bc'	22.6 ± 2.7
Mating box	0.31 ± 0.05 b	0.64 ± 0.09 b'	26.2 ± 0.8
Control	0.12 ± 0.03 a	0 ± 0.0 a'	29.0 ± 0.4

Bb mated: females that mated with contaminated males; Bb unmated: females in contact with contaminated males without mating; Mating box: females placed alone during 24 h in the mating box; Control: females in contact with uncontaminated males. Different letters indicate significantly different means (GLM, $P < 0.05$). Mean survival times are computed with Kaplan-Meier analysis and limited to 30 days.

Out of the 30 female flies used to quantify the conidia intake after contact with contaminated males, only one did not mate. We could therefore not compare the number of conidia present on mated and unmated females. Female flies that mated or were in contact with males 1 h after their contamination picked up an average of $1.4 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^2$ conidia, significantly more than flies that spent 24 h in the mating box, which picked up $2.9 \times 10^2 \pm 4.9 \times 10^1$ conidia ($F_{1, 145} = 177.0$; $P < 0.0001$).

We recorded significantly more mycosis on cadavers of females that mated with contaminated males than on females used to control boxes contamination, but no differences with females in contact with contaminated males without mating (Table 2).

c. Spore transmission 24 hours after male contamination

Kaplan-Meier survival analysis showed that when male flies used for conidia transmission were isolated for 24 h before being put in contact with females, the treatment had no significant effect on female survival curves ($\chi^2 = 7.2$, $DF = 3$, $P = 0.07$; Fig 2). Female mean survival times were more than 23 days long in the four treatments (Table 3). The treatment had not significant effect on the mortality rate ($\chi^2 = 7.0$, $DF = 3$, $P = 0.07$) (Table 3). Females in contact with contaminated males picked up an average of 4.5 ± 1.7 conidia per fly.

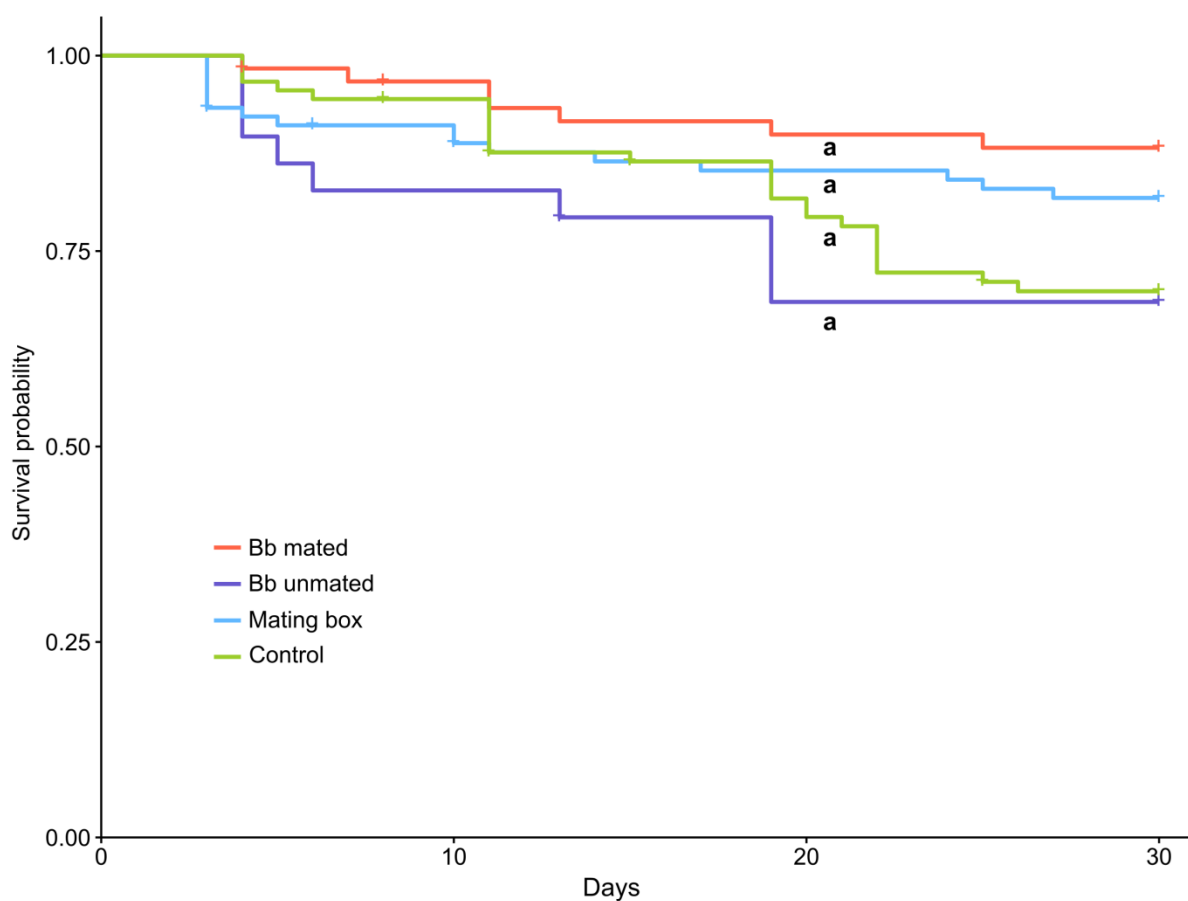


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves for female *Zeugodacus cucurbitae*. Male flies were contaminated with *Beauveria bassiana* conidia and isolated during 24 hours. Bb mated: females that mated with contaminated males; Bb unmated: females in contact with contaminated males without mating; Mating box: female placed alone during 24 h in the mating box; Control: females in contact with uncontaminated males. Different letters indicate significantly different curves (log-rank test, $P < 0.05$ after Sidak's correction). Crosses indicate censored data.

Table 3. Female *Zeugodacus cucurbitae* mortality and survival.

Male flies were contaminated with *Beauveria bassiana* conidia and isolated for 24 hours

Treatment	Mortality rate after 30 days (mean ± SEM)		Mean survival time (mean ± SEM) in days
	Total	With mycosis	
Bb Mated	0.11 ± 0.04 b	0.43 ± 0.19	28.0 ± 0.8
Unmated	0.31 ± 0.09 a	0 ± 0.0	23.8 ± 1.9
Mating box	0.18 ± 0.04 ab	0 ± 0.0	26.4 ± 0.9
Control	0.27 ± 0.05 a	0 ± 0.0	25.9 ± 0.8

Bb mated: females that mated with contaminated males; Bb unmated: females in contact with contaminated males without mating; Mating box: females placed alone during 24 h in the mating box; Control: females in contact with uncontaminated males. Different letters indicate significantly different means (GLM, $P < 0.05$). Mean survival times are computed with Kaplan-Meier analysis and limited to 30 days.

Discussion

We demonstrated that *B. bassiana* conidia transmission from males to females *Z. cucurbitae* occurred, that this transmission reduced female survival and that this transmission was increased when mating occurred. The mean survival time of females that mated with contaminated males was reduced by a two-fold factor. Horizontal transmission of entomopathogenic fungi through mating or simple contact has been reported in other fruit fly species (Dimbi et al., 2013; Quesada-Moraga et al., 2008; Toledo et al., 2007) as well as in other Diptera including house flies (Baker *et al.*, 2017), mosquitoes (Garcia-Munguia *et al.*, 2011) and tsetse flies (Maniania *et al.*, 2013). We also recorded more mycosis on dead mated female flies than on unmated. It is possible that females picked up more conidia during mating and that mycosis development is dose-dependent. But this theory could not be tested, and in a study by Tefera and Pringle (2003), mycosis was on the contrary higher when lower conidia concentrations were used. Mycosis can promote dissemination of the pathogen in the fly population if healthy flies come into contact with sporulated cadavers, as demonstrated by Renn *et al.* (1999). Our experimental design revealed that horizontal transmission of *B. bassiana* occurred during mating but that females can also become infected by simple contact with males through courtship and mating attempts. We also detected an experimental bias caused by the contamination of the mating cages by contaminated males. This ‘passive’

contamination caused a significant mortality increase in females introduced alone in the contaminated cages. This unwanted contamination was never taken in account by previously horizontal transmission studies and makes therefore their interpretation cautious.

We have demonstrated that the time window during which the conidia transmission was efficient lasted less than 24 h. For an auto-dissemination strategy to work with this fungus, the male should mate with a female within the 24 hours following its contamination in the auto-inoculation device. We showed that the amount of conidia available for transmission on contaminated males dropped over time. Dimbi *et al.* (2013) obtained similar results on *Ceratitis cosyra* flies contaminated with *M. anisopliae*. This could be explained by the increased grooming behavior observed after treatment (Dimbi *et al.*, 2013). But despite the grooming, male flies still carried 9.1×10^4 conidia per fly 24 hours after their contamination. It is possible that a large proportion of conidia could not be recovered because they were already germinated or adhered on the cuticle. It has been shown that conidia started to germinate on the insect cuticle as early as 12 hours after infection (Robinson, 1966). The conidia formulation could be optimized to increase the number of conidia picked up by a single fly and/or to facilitate the horizontal transmission of conidia. Adhesive powders can be used as carrier particles for entomopathogens and have been reported to allow transfer during mating (Barton *et al.*, 2006).

The mating success of male flies was not significantly affected by the *B. bassiana* treatment, even 24 hours after infection. Similar observations were made for other Diptera, showing that the number of matings for contaminated males is not generally different from fungus-free males up to three days post-infection (Maniania *et al.*, 2013; Novelo-Rincón *et al.*, 2009; Thaochan & Ngampongsai, 2015; Toledo *et al.*, 2007). It is critical that contaminated males be as competitive as healthy males, otherwise the spore transmission would not be as effective. In our case, the males started dying from fungal infection on the fifth day after treatment. The effects on fungal infection on insect behaviour are not usually observed until the last few hours before death (Dimbi *et al.*, 2009). The *B. bassiana* strain used in our study provides the male flies with enough time to find females and to mate. Male *Z. cucurbitae* are also known to form leks during courtship, where male flies aggregate and fight to defend their mating territory (Iwahashi & Majima, 1986). Male contaminated with *B. bassiana* could infect healthy males in these leks by contact and further disseminate the fungus in the fly population (Thaochan & Ngampongsai, 2015).

Our results confirm the potential of using entomopathogenic fungi in auto-dissemination strategies to control fruit flies. If these results can be reproduced in the field, the melon fly population could be reduced, decreasing their impact on crops. An auto-inoculation device will have to be designed and a suitable conidia formulation developed before field studies can be carried out.

Acknowledgments

This work i/ was co-founded by the European Union : Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD), by the Conseil Départemental de La Réunion and by the Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement (CIRAD), ii/ was supported by the French Ministry for Agriculture, Agroalimentary and Forestry (MAAF), the French Ministry for Ecology, Sustainable Development and Energy (MEDDE) and received financial support from ONEMA as part of the "PSPE 2" APR AttractMyFly project that associates CIRAD, Arysta LifeScience, Natural Plant Protection, Betel Reunion, AB7 Innovation and L'ARMEFLHOR iii/ by the ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) through the CIFRE Ph.D grant N°2014/1446 of C. Rohrllich. The authors would like to thank S. Glénac and J. Payet for rearing the insects, M. Payet and H. Telismart for technical help for the laboratory work.

References

- Baker, D. K., Rice, S. J., Leemon, D. M., & James, P. J. (2017). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitacea) and the effects of infection on oviposition rate in laboratory populations of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*.
- Barton, L., Armsworth, C., Baxter, I., Poppy, G., Gaunt, L., & Nansen, C. (2006). Adhesive powder uptake and transfer by Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(5), 257-262.
- Bautista, R. C., Harris, E. J., Vargas, R. I., & Jang, E. B. (2004). Parasitization of melon fly (Diptera: Tephritidae) by *Fopius arisanus* and *Psytalia fletcheri* (Hymenoptera: Braconidae) and the effect of fruit substrates on host preference by parasitoids. *Biological Control*, 30(2), 156-164.
- De la Rosa, W., Lopez, F., & Liedo, P. (2002). *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 36-43.
- De Meyer, M., Delatte, H., Nwatawala, M., Quilici, S., Vayssieres, J., & Virgilio, M. (2015). A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)(Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*.
- Dhillon, M., Singh, R., Naresh, J., & Sharma, H. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, 5(40), 1-16.
- Dimbi, S., Maniania, N., & Ekesi, S. (2013). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. *Insects*, 4(2), 206-216.
- Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2009). Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. *Biological Control*, 50(2), 111-116.
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, 156(4), 375-382.

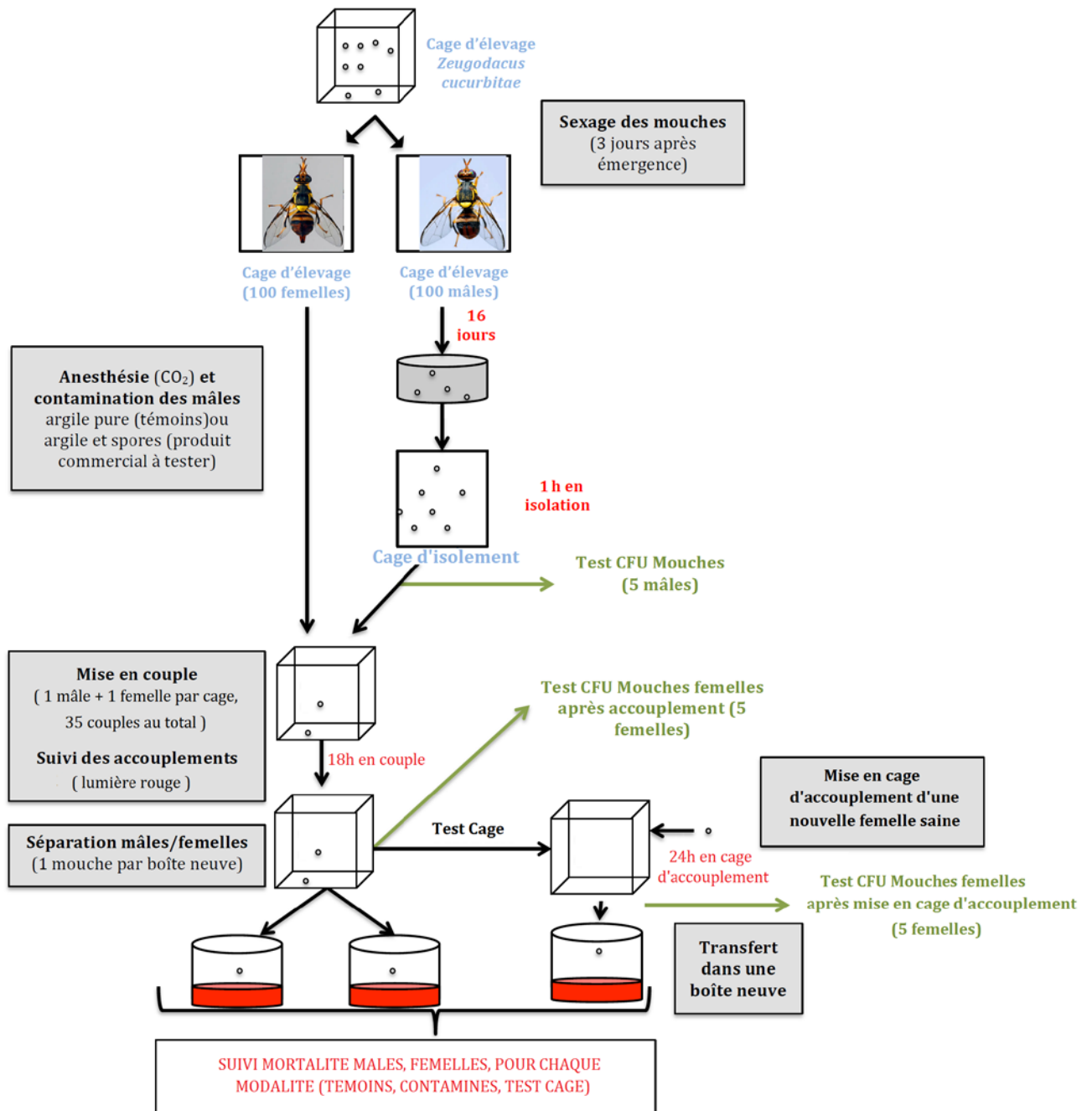
- Duyck, P. F., & Quilici, S. (2002). Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Bulletin of Entomological Research*, 92(6), 461-469.
- Ekesi, S., Dimbi, S., & Maniania, N. (2007). The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In S. Ekesi & N. K. Maniania (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management* (pp. 239-274).
- Ekesi, S., Maniania, N., & Lux, S. (2002). Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 12(1), 7-17.
- Garcia-Munguia, A. M., Garza-Hernandez, J. A., Rebollar-Tellez, E. A., Rodriguez-Perez, M. A., & Reyes-Villanueva, F. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 4(24), 1-6.
- Iwahashi, O., & Majima, T. (1986). Lek formation and male-male competition in the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 21(1), 70-75.
- Jang, E. B., Carvalho, L. A., Chen, C.-C., & Siderhurst, M. S. (2017). Cucumber Lure Trapping of *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii and Taiwan: Longevity and Nontargets Captures. *Journal of Economic Entomology*, 110(1), 201-207.
- Jang, E. B., & Light, D. M. (1996). Olfactory semiochemicals of tephritids. In B. A. McPherson & G. J. Steck (Eds.), *Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management* (pp. 73-90). Delray Beach, FL: St. Lucie Press.
- Maniania, N. K., Okech, M. A., Adino, J. O., Opere, J. O., & Ekesi, S. (2013). Transfer of inoculum of *Metarhizium anisopliae* between adult *Glossina morsitans morsitans* and effects of fungal infection on blood feeding and mating behaviors. *Journal of Pest Science*, 86(2), 285-292.
- Manrakhan, A. (2006). Fruit fly monitoring - Purpose, tools and methodology. In S. Ekesi & M. K. Billah (Eds.), *Field guide to the management of economically important tephritid fruit flies in Africa* (pp. 14). Nairobi, Kenya: ICIPE Science Press.
- McQuate, G. T., Liquido, N. J., & Nakamichi, K. A. (2017). Annotated world bibliography of host plants of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)(Diptera: Tephritidae).

- Navarro-Llopis, V., Ayala, I., Sanchis, J., Primo, J., & Moya, P. (2015). Field efficacy of a *Metarhizium anisopliae*-based attractant–contaminant device to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *108*(4), 1570-1578.
- Novelo-Rincón, L., Montoya, P., Hernández-Ortíz, V., Liedo, P., & Toledo, J. (2009). Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Dipt., Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Journal of Applied Entomology*, *133*(9-10), 702-710.
- Prokopy, R. J., Miller, N. W., Piñero, J. C., Barry, J. D., Tran, L. C., Oride, L., & Vargas, R. I. (2003). Effectiveness of GF-120 fruit fly bait spray applied to border area plants for control of melon flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *96*(5), 1485-1493.
- Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., & Santiago-Álvarez, C. (2008). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, *47*(1), 115-124.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *99*(6), 1955-1966.
- Renn, N., Bywater, A., & Barson, G. (1999). A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. *Journal of Applied Entomology*, *123*(5), 309-314.
- Robinson, R. (1966). Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Articles & News Summaries. Section B. Plant Disease Control*, *12*(2-3), 131-142.
- Rohrlich, C., Merle, I., Mze Hassani, I., Verger, M., Zuin, M., Besse, S., Robène, I., Nibouche, S., & Costet, L. (2018). Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *PLoS One*, *13*(7), 1-15.
- Ryckewaert, P., Deguine, J.-P., Brévault, T., & Vayssières, J.-F. (2010). Fruit flies (Diptera: Tephritidae) on vegetable crops in Reunion Island (Indian Ocean): state of knowledge, control methods and prospects for management. *Fruits*, *65*(2), 113-130.
- San Andrés, V., Ayala, I., Abad, M. C., Primo, J., Castañera, P., & Moya, P. (2014). Laboratory evaluation of the compatibility of a new attractant contaminant device

- containing *Metarhizium anisopliae* with *Ceratitis capitata* sterile males. *Biological Control*, 72, 54-61.
- SAS Institute. (2010). SAS/STAT (Version 9.3). Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sookar, P., Bhagwant, S., & Allymamod, M. N. (2014). Effect of *Metarhizium anisopliae* on the fertility and fecundity of two species of fruit flies and horizontal transmission of mycotic infection. *Journal of Insect Science*, 14(100), 1-12.
- Sookar, P., Bhagwant, S., Khayrattee, F. B., Chooneea, Y., & Ekesi, S. (2013). Mating compatibility of wild and sterile melon flies, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) treated with entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Entomology*, 138(6), 409-417.
- Steiner, L., Mitchell, W., Harris, E., Kozuma, T., & Fujimoto, M. (1965). Oriental fruit fly eradication by male annihilation. *Journal of Economic Entomology*, 58(5), 961-964.
- Suzuki, Y., & Koyama, J. (1980). Temporal aspects of mating behavior of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae): a comparison between laboratory and wild strains. *Applied Entomology and Zoology*, 15(3), 215-224.
- Tan, K. H., Nishida, R., Jang, E. B., & Shelly, T. E. (2014). Pheromones, male lures, and trapping of tephritid fruit flies *Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies* (pp. 15-74): Springer.
- Thaochan, N., & Ngampongsai, A. (2015). Effects of autodisseminated *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 629-644.
- Toledo, J., Campos, S. E., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J. F., Villaseñor, A., & Montoya, P. (2007). Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory and Field Cage Conditions. *Journal of Economic Entomology*, 100(2), 291-297.
- Toledo, J., Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., Enkerlin, W., Liedo, P., Valle, Á., & Montoya, P. (2017). Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.
- Vega, F. E., Dowd, P. F., Lacey, L. A., Pell, J. K., Jackson, D. M., & Klein, M. G. (2007). Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In L. A. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), *Field manual of techniques in invertebrate pathology* (pp. 127-146): Springer Netherlands.

- Virgilio, M., Delatte, H., Backeljau, T., & De Meyer, M. (2010). Macrogeographic population structuring in the cosmopolitan agricultural pest *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, 19(13), 2713-2724.
- Yamagishi, M., & Tsubaki, Y. (1990). Copulation duration and sperm transfer in the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 25(4), 517-519.
- Yosiaki, I., Kakinohana, H., Yamagishi, M., & Kohama, T. (2003). Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, from Okinawa, Japan, by means of the sterile insect technique, with special emphasis on the role of basic studies. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 6(2), 119-129.

Annexe chapitre 2 : Schéma du dispositif expérimental des tests de transmission de spores de *Beauveria bassiana* chez *Zeugodacus cucurbitae* (auteur : Damien Verger).



Chapitre 3: Diversité génétique des populations de *Beauveria hoplocheli* et devenir d'une souche commerciale au cours d'une culture dans l'agrosystème canne à sucre à La Réunion

Introduction

La canne à sucre est le pilier de l'agriculture de La Réunion. Cette culture occupe 57 % de la surface agricole utile, soit environ 22 000 ha en 2015 (CTICS, 2015), et produit 33 % de la valeur agricole de l'île (Agreste, 2013). Plus de 10500 personnes travaillaient dans une des 3084 exploitations cannières recensées en 2015 (Agreste, 2011; CTICS, 2015). Plus de 1,8 millions de tonnes de canne à sucre sont récoltées chaque année, permettant la production d'environ 201000 tonnes de sucre (CTICS, 2015). La production de sucre génère également des coproduits valorisables notamment la mélasse (résidu sucré non cristallisable), utilisée pour la production de rhum traditionnel, ainsi que la bagasse, le résidu fibreux qui alimente les centrales électriques et permet de produire près de 8 % de l'électricité réunionnaise (SPL Energies Réunion, 2017).

Dans les années 1980, cette culture a été menacée par un nouveau ravageur dévastateur, un ver blanc qui dévore les racines des souches de canne à sucre (Vercambre *et al.*, 1988). Ce ravageur est détecté pour la première fois en 1981 dans l'Ouest de l'île. Il s'agit du hanneton *Hoplochelus marginalis*, endémique de Madagascar. Il a probablement été introduit accidentellement à La Réunion au début des années 1970, au moment du rapatriement de militaires français de Madagascar (Vercambre *et al.*, 1990). Le front d'attaque progresse rapidement, 15 à 18 % des surfaces de canne à sucre sont touchées en 1988 et l'ensemble de l'île est envahi dès 1995 (Vercambre *et al.*, 2008). Le cycle biologique de *H. marginalis* dure un an, les adultes volent et se reproduisent de novembre à janvier. De mars à août, les larves de troisième stade causent des dégâts sur la canne à sucre, mais aussi sur d'autres plantes cultivées ou non, notamment les cultures semi-pérennes (géranium rosat, ananas, fraisier, prairies). Dès 1982, un groupe de travail réunissant Service de Protection des Végétaux de la Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de La Réunion, la Chambre

d'Agriculture, l'IRAT (Cirad actuel), l'INRA, la FDGDEC (FDGDON actuelle), l'Université de La Réunion et les acteurs de la filière canne est formé pour étudier le ravageur et développer une stratégie de contrôle. Différents moyens de lutte sont testés, dont la lutte agronomique (sélection variétale, labour), le piégeage lumineux des adultes et la lutte chimique à l'aide d'un insecticide organochloré, le Lindane (gamma-hexachlorocyclohexane), ou d'organophosphorés tel que le MOCAP (ethoprophos) puis le Suxon (chlorpyrifos-éthyl) à partir de 1987. La lutte biologique est envisagée dès 1983 et, en l'absence d'ennemis naturels efficaces à La Réunion, des tests sont réalisés, sans succès, à l'aide de plusieurs insectes parasitoïdes introduits (dont *Campsomeris phalerata*, *C. eythrogaster*, *Tiphia parallela* en provenance de Madagascar ou Maurice) ainsi que de microorganismes entomopathogènes issus de collections (champignons, bactéries, protistes ou virus) (Vercambre *et al.*, 1990). Des prospections sont organisées à Madagascar dans la zone d'origine du ravageur. En 1987, des larves de *H. marginalis* contaminées par un champignon du genre *Beauveria* sont ramenées à La Réunion et utilisées pour infecter des larves réunionnaises par contact. Des tests préliminaires sont réalisés en 1988 en plaçant des larves infectées par ces *Beauveria* spp. dans des sillons de parcelles de canne à sucre lors de la plantation. Les tests sont conduits chez deux planteurs de Bellemène et de la Saline-les-Hauts en mars 1988 (Vercambre, communication personnelle, 2008) et montrent des résultats prometteurs (Vercambre *et al.*, 2008). Les souches de champignon ont d'abord été qualifiées de *B. tenella* puis identifiées comme appartenant à l'espèce *B. brongniartii*. Plus tard, une étude plus approfondie montre qu'il s'agit d'une nouvelle espèce : *B. hoplocheli* (Robène-Soustrade *et al.*, 2015). Entre 1989 et 1993, plusieurs essais d'homologation ont permis de montrer l'efficacité d'une souche de *B. hoplocheli* (Bt96) pour maintenir les populations de *H. marginalis* en dessous du seuil de nuisibilité économique, évalué à quatre larves par souche de canne à sucre, deux ans après un traitement unique (Vercambre *et al.*, 1993; Vercambre *et al.*, 1994). Le champignon est dans un premier temps produit de façon artisanale sous forme de riz sporisé. En 1996, la société BETEL-Réunion est créée par l'INRA et l'entreprise NPP pour produire de façon industrielle une formulation de *B. hoplocheli* sur substrat argileux, le Betel. Le produit est alors utilisé en association avec le Suxon (Mouret *et al.*, 2017).

Depuis 1989, *H. marginalis* est un organisme réglementé qui fait l'objet d'une lutte obligatoire par arrêté préfectoral reconduit périodiquement (Préfecture de La Réunion, 2013). Le traitement conditionne l'obtention d'aides à la replantation. A partir de 2008, le Suxon est interdit et la lutte obligatoire se poursuit avec le Betel uniquement. La souche B507 utilisée

dans le produit Betel en tant que matière active n'est plus homologuée mais bénéficie depuis 2009 d'une dérogation ministérielle qui autorise son usage en culture de canne à sucre à La Réunion (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2009).

Un test de diagnostic spécifique de *B. hoplocheli* basé sur la PCR a été mis au point dans l'unité PVBMT. Cet outil a permis de détecter la souche de *B. hoplocheli* utilisée en lutte biologique dans 95 parcelles de canne à sucre sur toute l'île de La Réunion, dans des prélèvements de sol de 2007. D'autres travaux de 2007 au laboratoire ont permis de valider l'utilisation de sept marqueurs microsatellites développés pour les espèces *B. brongniartii* (Enkerli *et al.*, 2001) et *B. bassiana* (Rehner & Buckley, 2003) pour révéler du polymorphisme chez l'espèce *B. hoplocheli*. L'utilisation de ces marqueurs sur 80 isolats collectés entre 2001 et 2004 en parcelle de canne à sucre a révélé l'existence d'au moins 28 profils génétiques différents (non publié). Vingt-quatre marqueurs microsatellites supplémentaires ont été développés au laboratoire (Souffou et Hassani, 2014 ; Costet *et al.* 2015) spécifiquement pour l'espèce *B. hoplocheli* et leur utilisation sur le terrain doit être validée.

La persistance et la diffusion du myco-insecticide dans l'agrosystème sont aujourd'hui très mal connues alors que ce sont des déterminants majeurs de la durabilité de la lutte biologique. Nous souhaitons savoir si le champignon introduit il y a 30 ans et utilisé sur toute l'île depuis s'est établi durablement dans les parcelles de canne à sucre, et quel est l'effet du traitement sur les populations de *Beauveria* spp. présentes dans le sol. Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour objectif de caractériser la diversité génétique des souches de *B. hoplocheli* au cours d'un cycle de culture de la canne à sucre. Un réseau de parcelles de canne à sucre permettra un suivi spatiotemporel du myco-insecticide, qui doit pouvoir apporter des éléments de réponse concernant la durabilité de cette lutte biologique.

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage

L'année T₀ (2015), avant plantation de la canne à sucre et épandage du Betel, qui a lieu au moment de la plantation, des prélèvements de sol ont été réalisés dans 18 parcelles de canne à sucre réparties sur l'île de La Réunion (Figure 1). Le nombre d'années depuis la dernière

plantation dépendait des parcelles, et certaines étaient en friche (aucune culture) au moment du premier prélèvement (Tableau 1). L'échantillonnage T₁ a été réalisé en 2016, en moyenne $6 \pm 2,5$ mois après plantation et épandage de la souche B507 de *B. hoplocheli*. Des prélèvements ont été réalisés pour 14 parcelles parmi les 18 échantillonnées à T₀, quatre parcelles n'ayant pas été replantées. L'échantillonnage T₂ a eu lieu en 2017 dans les parcelles échantillonnées à T₁, dans la mesure du possible un an après T₁ pour que les deux prélèvements soient réalisés durant la même période de l'année (Tableau 1).

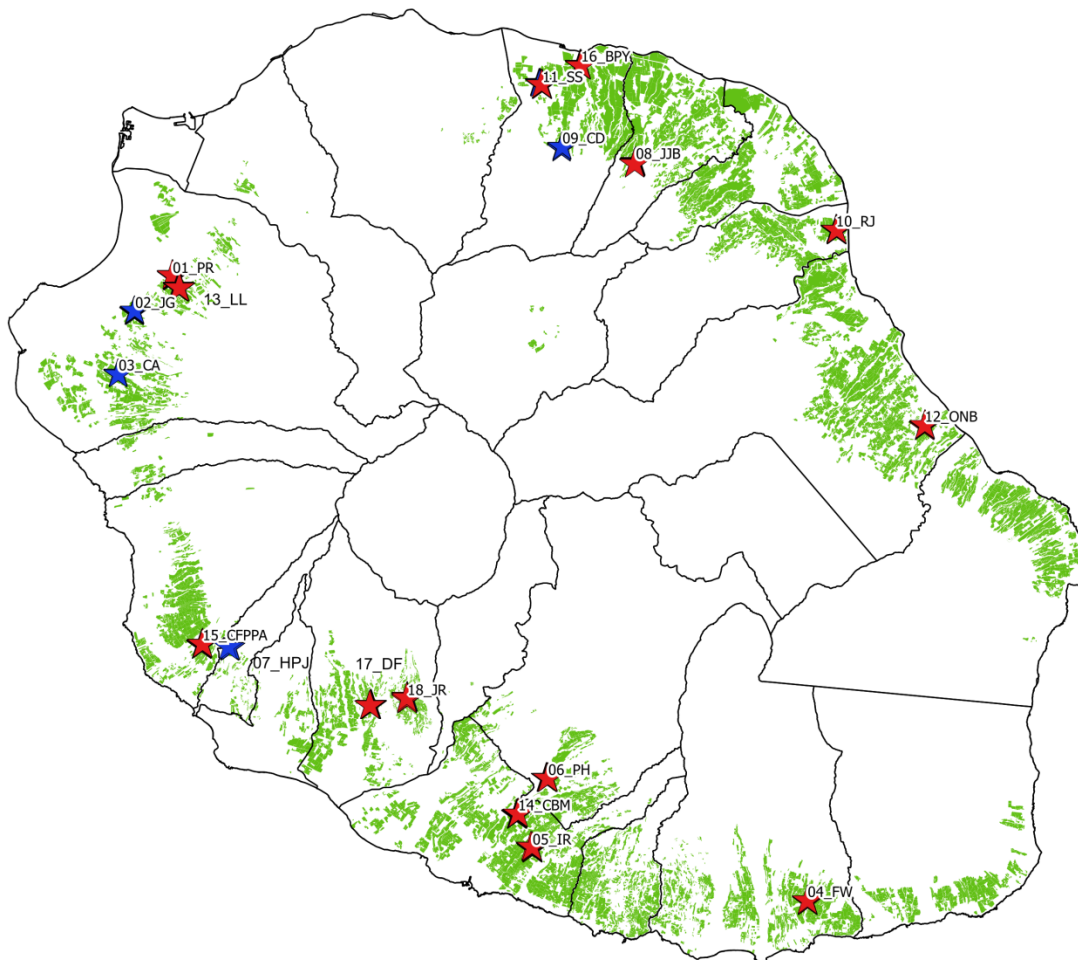


Figure 1 : Localisation sur l'île de La Réunion des parcelles de canne à sucre échantillonnées. Etoile rouge : parcelle échantillonnée à T₀ avant plantation et traitement Betel, à T₁ l'année suivant la plantation et à T₂ deux ans après ; étoile bleue : parcelle échantillonnée à T₀ seulement. L'ensemble des parcelles de canne à sucre est représenté en vert (Source : Base agricole de l'occupation du sol, 2016).

Tableau 1 : Caractéristiques des parcelles et dates d'échantillonnage avant plantation et traitement avec *B. hoplocheli* (T₀), l'année suivant la plantation et le traitement (T₁) et deux ans après (T₂).

Parcelle	Altitude (m)	Nombre d'années depuis la dernière plantation	Statut de la parcelle avant T ₀ ¹	Date de prélèvement T ₀	Date de plantation	Date de prélèvement T ₁	Date de prélèvement T ₂
01_PR	456	20	B	17/02/2015	inconnue	13/07/2016	05/09/2017
02_JG	484	25	B	17/02/2015	pas de plantation	non prélevée	non prélevée
03_CA	530	25	B	24/02/2015	pas de plantation	non prélevée	non prélevée
04_FW	363	15	B	18/03/2015	22/09/2015	06/06/2016	12/06/2017
05_IR	308	6	A	24/03/2015	26/08/2015	11/04/2016	24/04/2017
06_PH	548	10	A	25/03/2015	27/01/2016	11/07/2016	18/09/2017
07_HPJ	716	20	B	08/04/2015	pas de plantation	non prélevée	non prélevée
08_JJB	475	5	A	16/04/2015	18/05/2015	12/07/2016	11/07/2017
09_CD	565	5	A	21/04/2015	pas de plantation	non prélevée	non prélevée
10_RJ	19	6	A	27/04/2015	15/11/2015	13/06/2016	19/06/2017
11_SS	128	na	C	11/06/2015	01/12/2015	22/06/2016	11/07/2017
12_ONB	110	na	C	23/07/2015	07/09/2015	17/06/2016	12/06/2017
13_LL	584	20	B	11/08/2015	02/02/2016	01/08/2016	24/07/2017
14_CBM	300	5	A	09/10/2015	14/03/2016	07/09/2016	16/10/2017
15_CFPPA	542	na	C	24/11/2015	30/11/2015	16/08/2016	27/09/2017
16_BPY	59	6	A	25/01/2016	26/01/2016	22/06/2016	03/10/2017
17_DF	357	5	A	27/01/2016	01/02/2016	19/08/2016	31/10/2017
18_JR	540	5	A	05/02/2016	23/03/2016	19/08/2016	03/08/2017

¹A: dernière plantation de canne à sucre date de moins de dix ans ; B: dernière plantation de canne à sucre date de plus de dix ans ; C: la parcelle est en friche, sans culture.

Pour chaque parcelle, 20 échantillons de sol ont été prélevés dans des zones séparées d'une vingtaine de mètres les unes des autres et réparties sur ½ à 1 hectare. Chaque échantillon de sol correspond à cinq prélèvements répartis sur environ 1 m² autour d'une souche de canne à sucre si la parcelle était plantée de canne à sucre. Le sol a été prélevé à l'aide d'une tarière de 10 cm de diamètre et entre 10 et 30 cm de profondeur. La tarière a été nettoyée avec de l'éthanol 96 % entre deux échantillons. Chaque échantillon a été tamisé, homogénéisé puis conservé à 4°C jusqu'à trois mois. Un sous-échantillon a été placé à -20°C. Tous les échantillons de sol ont été géolocalisés et replacés sur la carte de La Réunion au moyen du logiciel de SIG QGIS 2.14 (QGIS Development Team, 2014).

Des larves de troisième stage de *H. marginalis* ont été prélevées dans sept parcelles de canne à sucre ou de thym. Les larves vivantes ont été placées en quarantaine individuellement dans

des boîtes en plastique de 125 mL contenant du terreau. Elles ont été nourries une fois par semaine avec un morceau de carotte issue de l'agriculture biologique. Lorsque les larves mortes développaient une mycose, nous avons coupé et congelé un morceau de la larve ou prélevé des conidies pour les mettre en culture sur un milieu semi-sélectif (Meyling, 2007).

2. Isolement des champignons entomopathogènes du sol par piégeage sur insecte « *Galleria bait* »

Pour isoler les champignons entomopathogènes des échantillons de sol, nous avons utilisé une méthode de piégeage sur insecte avec des larves de *Galleria mellonella* appelée *Galleria bait* (Zimmermann, 1986). Un élevage de *G. mellonella* est constamment maintenu au laboratoire à 25°C selon un protocole adapté de Meyling (2007) et le *Galleria bait* a été réalisé dans le mois qui suivait l'échantillonnage d'une parcelle. Pour chaque échantillon de sol, deux boîtes de Petri de 5 cm de diamètre ont été remplies avec 10 g de sol chacune, puis cinq larves ont été placées dans chaque boîte, avec un morceau de 2 x 2 cm de papier buvard stérile, humidifié avec 1 mL d'eau stérile. Les larves ont été préalablement trempées dans de l'eau à 56°C pendant cinq à dix secondes, afin de limiter leur production de soie (Meyling, 2007). Les boîtes de Petri ont ensuite été scellées avec du film plastique et placées en incubation à l'obscurité à 25°C. Pendant les sept premiers jours, les boîtes ont été retournées une fois par jour afin de stimuler le déplacement des larves pour que celles-ci entrent en contact avec le maximum de surface de sol. Des observations ont été réalisées après sept et quatorze jours afin de prélever les larves mortes ou mycosées. Les cadavres ont été prélevés puis désinfectés par un trempage de cinq secondes dans de l'éthanol à 70% puis cinq secondes dans de l'eau stérile. Ensuite, les larves désinfectées ont été coupées en deux à l'aide d'un scalpel stérile, puis une moitié a été conservée dans un tube eppendorf de 1,5 mL à -30°C. La seconde moitié a été placée sur un morceau de papier buvard stérile de 2 x 2 cm humidifié avec 1 mL d'eau stérile, dans une boîte de Petri de 5 cm de diamètre, pour favoriser le développement externe du champignon et pouvoir l'isoler par la suite.

3. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN des larves de *G. mellonella* ont été effectuées avec le kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) en suivant le protocole du fabricant, avec une modification au début. Les larves ont été broyées directement dans 400 µl de tampon AP1 et

4 µl de RNase sans congélation à l'azote liquide à l'aide du TissueLyser. L'ADN des cultures de *Beauveria* spp. isolées de larves de *H. marginalis* a été extrait avec le kit PowerSoil DNA Isolation (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA) en suivant le protocole du fabricant.

4. Amplification par PCR du gène *Pr1*

Le test diagnostique des *Beauveria* spp. mis au point au laboratoire est basé sur l'amplification du gène *Pr1*. Ce diagnostic met en jeu une PCR qui peut comporter deux étapes dites « nested ». En fonction de la sensibilité désirée, une étape (PCR primaire) ou les deux étapes (PCR secondaire) sont réalisées. Nous avons considéré qu'une larve de *G. mellonella* tuée par le champignon était colonisée par celui-ci et contenait une quantité suffisante d'ADN de *Beauveria* spp. Une simple PCR a donc été réalisée pour détecter le champignon.

La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL contenant du MgCl₂ à 2 mM, des dNTPs à 0,2 mM, le couple d'amorces BB_Pr1_137U et BB_Pr1_539L à 0,2 mM chacune, la Taq polymérase Go Taq Flexi (Promega) à 1,25 U/tube) et 3 µL d'ADN dilué au 1/10^e dans le tampon fourni par le fabricant dilué cinq fois. L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCRSystem 9700 (Applied Biosystems, CA, USA) selon le cycle suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles avec une étape de dénaturation de 60 secondes à 94°C, d'hybridation de 60 secondes à 67°C et d'élongation de 60 secondes à 72°C, pour finir par une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Une électrophorèse capillaire a ensuite été réalisée à l'aide d'un appareil QIAxcel (QIAGEN) pour détecter les amplicons. Une cartouche DNA Screening a été utilisée avec la méthode AM420 préprogrammée, à l'aide d'un marqueur de taille de 50-800 pb et d'un marqueur d'alignement de 15 pb-1kb. L'amplicon attendu fait 427 pb.

5. Génotypage microsatellites

Les échantillons d'ADN provenant du *Galleria* bait et des larves de *H. marginalis* présentant des amplicons d'environ 427 pb après la PCR diagnostique *Pr1* ont été génotypés en utilisant les loci microsatellites développés au laboratoire spécifiquement pour l'espèce *B. hoplocheli*. (Souffou et Hassani, 2014 ; Costet et al. 2015). Des ADN de souches de référence des espèces de *Beauveria* ainsi que des ADN de *B. hoplocheli* en collection ont également été génotypés avec les mêmes loci (Tableau 2). Des tests préliminaires avec les échantillons de l'année T₀ ont permis de sélectionner neuf loci parmi les 24 disponibles, en fonction du taux

d'amplification et du polymorphisme. Les amplifications PCR ont été réalisées en multiplexant les amorces dans deux mix en fonction des tailles des amplicons et des fluorophores utilisés. La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 15 µL avec le Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) dilué deux fois, de la Q-solution diluée cinq fois, les amorces multiplexée à 0,2 mM chacune et 1 µL d'ADN. L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCRSyst 9700 (Applied Biosystems) selon le cycle suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivi de 25 cycles avec une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'hybridation de 90 secondes à 55°C et d'élongation de 30 secondes à 72°C, pour finir par une élongation finale de 30 minutes à 60°C. Les produits PCR ont ensuite été analysés dans un génotypeur ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems). Le mix réactionnel contenait 10,8 µL de formamide, 0,2 µL de marqueur de taille GeneScan 500 LIZ et 1 µL de produit PCR. L'électrophorèse a été réalisée après 5 min de dénaturation à 95°C, puis 5 min sur de la glace. Les données de génotypage ont été traitées à l'aide du module Microsatellite du logiciel Geneious version 10.2.3 (Kearse *et al.*, 2012).

Tableau 2 : Liste des souches de référence génotypées, avec l'année d'isolement pour les souches de l'espèce *Beauveria hoplocheli*.

Espèce	Souche	Origine géographique	Année d'isolement
<i>Beauveria hoplocheli</i>	Bt96	Madagascar	1987
	Bt106	Madagascar	1989
	Bt108	Madagascar	1988
	Bt110	Réunion	1990
	Bt112	Madagascar	1990
	Bt115	Réunion	1992
	Bt116	Réunion	1993
	Bt121	Réunion	1993
	Bt123	Réunion	1993
	Bt124	Réunion	1993
	Bt125	Réunion	1993
	Bt126	Réunion	1993
	Bt129	Réunion	1994
	B507	Réunion	2005

Chapitre 3 – Diversité génétique de *B. hoplocheli*

<i>B. amorpha</i>	ARSEF 2641	Brésil
	ARSEF 4149	Australie
	ARSEF 7542	USA, Colorado
<i>B. asiatica</i>	ARSEF 4384	China
	ARSEF 4850	Corée du Sud
<i>B. australis</i>	ARSEF 4580	Australie
	ARSEF 4598	Australie
	ARSEF 4622	Australie
<i>B. bassiana</i>	ARSEF 1478	Brésil
	ARSEF 1564	Italie
	ARSEF 1848	Belgique
<i>B. brongniartii</i>	ARSEF 617	France
	ARSEF 6214	USA, New York
	ARSEF 7376	USA, Maryland
<i>B. caledonica</i>	ARSEF 2567	Ecosse
	ARSEF 7117	USA, Georgia
<i>B. kipukae</i>	ARSEF 7032	USA, Hawaii
<i>B. lii</i>	ARSEF 11741	Chine
<i>B. malawiensis</i>	ARSEF 4755	Australie
<i>B. malawiensis</i>	ARSEF 7760	Malawi
<i>B. pseudobassiana</i>	ARSEF 3216	USA, Wisconsin
	ARSEF 3405	USA, Kentucky
	ARSEF 4933	France
<i>B. sungii</i>	ARSEF 1685	Japon
	ARSEF 5689	Corée du Sud
<i>B. varroae</i>	ARSEF 2694	Suisse
	ARSEF 8257	France
	ARSEF 8259	France
<i>B. vermiconia</i>	ARSEF 2922	Chili

6. Analyse des données microsatellites

Les analyses de génétique des populations ont été réalisées à l'aide des package RClone (Bailleul *et al.*, 2016) et poppr (Kamvar *et al.*, 2014) sur le logiciel R. Les profils microsatellites complets, obtenus lorsque les neuf loci étaient amplifiés, ont permis de définir des génotypes multilocus, ou MLG. Pour décrire la diversité clonale, nous avons calculé l'indice de richesse clonale $R = (G-1)/(N-1)$, où G est le nombre de MLG détectés et N le nombre d'échantillons de sol pour lequel au moins un MLG a été amplifié. Nous avons utilisé le terme de « ramet », défini comme une unité d'échantillonnage d'un MLG, ou clone, d'après Arnaud-Haond *et al.* (2007). Les courbes d'accumulation des MLG en fonction du nombre de loci et du nombre de ramets ont été réalisées. Un test de recombinaison a été réalisé en utilisant l'approximation \bar{r}_d de l'index d'association I_A (Agapow & Burt, 2001; Brown *et al.*, 1980), calculée à partir de 1000 permutations des fréquences alléliques de l'ensemble de la population.

Un réseau d'haplotypes ou arbre de recouvrement minimal (Minimum Spanning Tree) consiste en une représentation graphique des différents haplotypes et des liens qui existent entre eux. Un arbre de recouvrement minimal a été construit grâce au logiciel PHYLOViZ 2.0 (Nascimento *et al.*, 2016) en utilisant les distances goeBURST. Cette option permet de construire l'arbre en fonction du nombre de loci polymorphes entre haplotypes mais de prendre également en compte le nombre de répétitions les différenciant sur chaque locus polymorphe. Une Analyse en Composante Principale (ACP) a été réalisée sur les MLG à l'aide du package ggfortify sur le logiciel R. Une méthode de clustering bayésien a été utilisée afin de tester des hypothèses quant au nombre de sous-populations génétiques (ou clusters) contenues dans le jeu de données des MLG. A l'issue de l'analyse, basée sur la réalisation de plusieurs chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC), le nombre de clusters (K) le plus probable est retenu et les MLG peuvent être assignés à chacun des clusters. Le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) a été utilisé, sous le modèle de mélange « admixture model » avec des K variant de 1 à 10, réitérés 20 fois afin de vérifier la cohérence des données, et avec une longueur de MCMC de 500 000 avec 200 000 de temps de stabilisation des données (burnin). Le K le plus probable a été estimé en suivant la méthode d'Evanno *et al.* (2005) à l'aide de l'outil en ligne Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

Résultats

Nous avons génotypé un total de 1242 larves de *G. mellonella* qui étaient positives à la PCR diagnostic *Pr1*. Nous avons obtenu au moins un profil microsatellite pour 464 de ces larves, dont 390 pour lesquelles un seul MLG a été amplifié, 64 pour lesquelles deux MLG ont été amplifiés et 8 pour lesquelles trois MLG ont été amplifiés. Concernant les prélèvements de larves de *H. marginalis*, 210 échantillons ont été génotypés, dont la moitié étaient des extraits ADN de larves mycosées et l'autre moitié des extraits de cultures de champignon isolées de larves. Les larves provenaient de sept parcelles et 48 % des larves ont été prélevées dans la même parcelle à Petite Ile. Un profil microsatellite a été obtenu pour 141 échantillons issus de vers blancs.

Les neuf loci microsatellites utilisés étaient polymorphes, avec un nombre d'allèles compris entre cinq et dix (Tableau 3). Un total de 37 MLG a pu être détecté en champ de canne à sucre.

Tableau 3 : Caractéristiques des loci microsatellites utilisés dans cette étude.

Locus	Motif	Nombre d'allèles	Taille (pb)	Taux d'amplification
Cir-Bh-45	(CCA) ₁₀	10	71-98	1,00
Cir-Bh-42	(ACG) ₁₀	9	117-162	0,99
Cir-Bh-84	(GAG) ₈	6	81-99	0,99
Cir-Bh-98	(GAG) ₈	7	74-92	1,00
Cir-Bh-76	(AGA) ₈	7	90-114	0,99
Cir-Bh-28	(TC) ₁₁	6	103-115	0,99
Cir-Bh-87	(GGA) ₈	5	98-110	1,00
Cir-Bh-47	(AC) ₁₀	6	181-193	0,91
Cir-Bh-44	(CGG) ₁₀	6	115-133	0,97

Le taux d'amplification a été calculé sur 300 ramets.

La courbe d'accumulation des génotypes en fonction du nombre de loci a montré une redondance entre marqueurs (Figure 2). Nous avons donc pour la suite des analyses conservé

uniquement quatre loci parmi les plus informatifs et ceux ayant le meilleur taux d'amplification : Cir-Bh-45, Cir-Bh-42, Cir-Bh-98 et Cir-Bh-87. Ces quatre loci ont permis d'identifier 36 MLG dans les échantillons de sol de canne à sucre, parmi lesquels 14 ont également été retrouvés sur *H. marginalis*, et deux MLG qui ont été trouvés seulement sur *H. marginalis*. En plus du MLG correspondant à la souche B507, six MLG correspondant à des souches de *B. hoplocheli* en collection ont été identifiés. Ces souches ont été isolées entre 1987 et 1993 à La Réunion ou à Madagascar sur *H. marginalis*. Lors du génotypage des souches d'autres espèces de *Beauveria* de référence, aucun profil complet des quatre loci microsatellites n'a été obtenu. Le locus Cir-45 a été amplifié uniquement pour des échantillons de *B. hoplocheli*, il semble donc que ce soit un locus spécifique de *B. hoplocheli*.

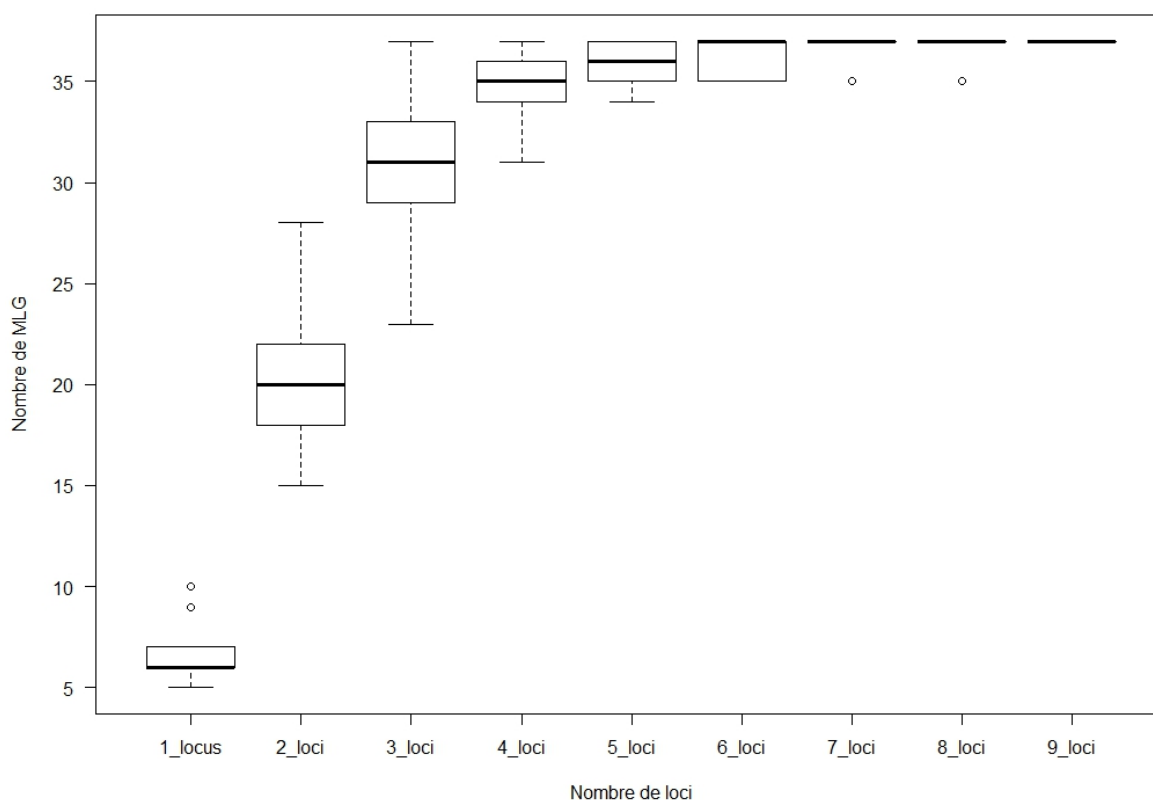


Figure 2 : Courbe d'accumulation des MLG en fonction du nombre de loci. Chaque boîte représente le nombre maximum, minimum et moyen de MLG détectés après 1000 ré-échantillonnage pour chaque nombre de loci.

Pour la suite des analyses, nous avons conservé un représentant de chaque MLG par échantillon. La richesse clonale totale était de 0,15, ce qui indique une diversité génétique de *B. hoplocheli* assez faible dans les parcelles de canne à sucre et suggère un mode de

reproduction clonale. Le nombre de larves de *G. mellonella* positives à la PCR *Pr1* et donc génotypées était plus important pour l'année T₀ que pour les suivantes, ce qui explique que le nombre de MLG détectés soit plus élevé l'année T₀ (Tableau 4). Mais les courbes d'accumulation des génotypes en fonction du nombre de ramets pour les trois années de prélèvement étaient superposées, la diversité génétique de *B. hoplocheli* en parcelle de canne à sucre n'a donc pas été modifiée dans les deux ans suivant la replantation et l'ajout de Betel (Figure 3). Ces courbes ont également montré que l'effort d'échantillonnage, même l'année T₀, n'a pas été suffisant pour révéler toute la diversité génétique des *B. hoplocheli* présents dans les cultures de canne à sucre (Figure 3).

Tableau 4 : Diversité génétique de la population de *Beauveria hoplocheli* en champ de canne à sucre en fonction de l'année de prélèvement.

Année de prélèvement	Nombre de ramets	Nombre de ramets correspondant au MLG de la souche B507			
		G	N	R	
T ₀	180	27	29	133	0,21
T ₁	70	13	20	55	0,35
T ₂	50	13	16	43	0,36
Total	300	53	36	231	0,15

G : nombre de MLG

N : nombre d'échantillons de sol pour lequel au moins un MLG a été amplifié

R : richesse clonale, $R = (G-1)/(N-1)$

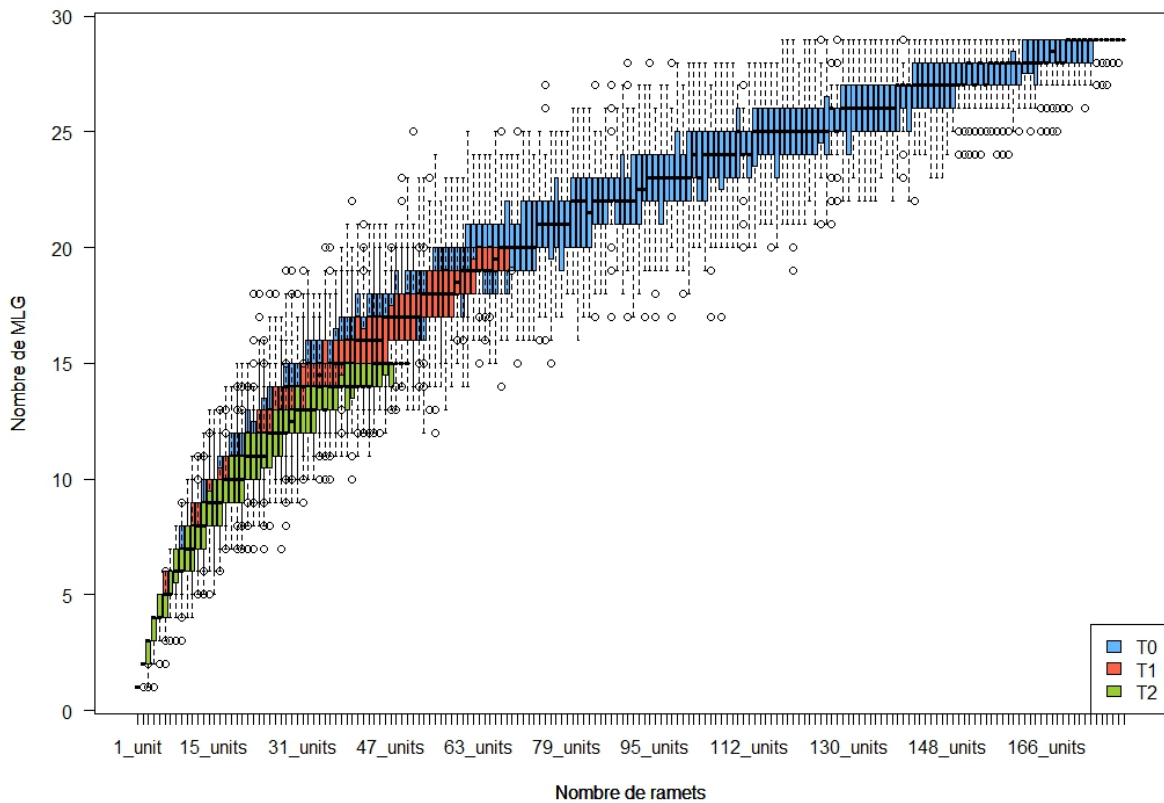


Figure 3 : Courbe d'accumulation des MLG en fonction du nombre de ramets. Chaque boîte représente le nombre maximum, minimum et moyen de MLG détectés après 100 ré-échantillonnage pour chaque nombre de loci. T₀ (bleu) : échantillonnage avant plantation et traitement Betel ; T₁ (rouge) : échantillonnage l'année suivant la plantation et le traitement ; T₂ (vert) : échantillonnage deux ans après la plantation et le traitement.

Le MLG de la souche commerciale B507 a été détecté dans 11 parcelles sur 18, et dans 52 échantillons de sol. C'est le MLG qui a été rencontré le plus souvent mais il n'est pas majoritaire, il représente 17,7 % de l'ensemble des ramets (Tableau 4). Le deuxième MLG le plus présent, celui de la souche Bt96, a été détecté dans 10 parcelles et 26 échantillons. Parmi les 36 MLG trouvés en parcelles de canne à sucre, huit ont été détectés dans plus de cinq parcelles (Annexe). L'année de prélèvement n'a pas eu d'effet sur la proportion de ramets correspondants au MLG de la souche B507 (Tableau 4). Ceci suggère que la replantation et l'ajout de Betel n'ont pas eu d'effet sur la proportion de la souche commerciale dans les deux ans suivant la replantation. Le génotypage de *B. hoplocheli* infectant des larves de *H. marginalis* a permis de retrouver 13 des 36 MLG présents en parcelles de canne à sucre, ainsi que deux nouveaux MLG (Annexe 1).

Le test de recombinaison basé sur l'index d'association a révélé une structure de la population fortement clonale (p -value < 0,001), sans recombinaison allélique liée à des événements de reproduction sexuée (Figure 4).

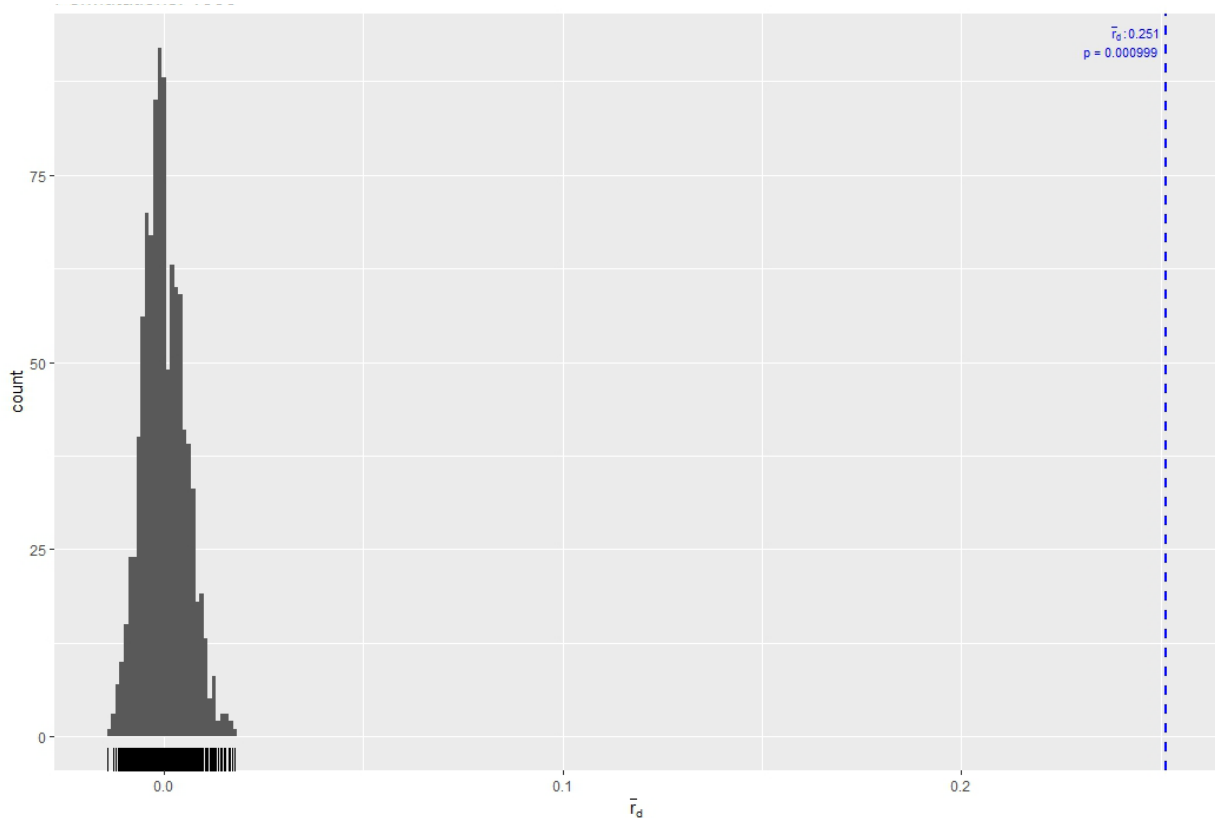


Figure 4 : Test de recombinaison sur les 300 ramets de la population de *Beauveria hoplocheli*. L'approximation \bar{r}_d de l'index d'association a été calculée à partir de 1000 permutations des fréquences alléliques.

Le réseau d'haplotypes des MLG de *B. hoplocheli* n'a pas fait apparaître de structure particulière de la population, tous les MLG ne formant qu'un seul groupe (Figure 5). Ce résultat est confirmé par l'ACP réalisée sur les MLG détectés lors de cette étude et entre 1987 et 1994 (Figure 6). Nous n'avons pas détecté de structuration en fonction des parcelles de canne à sucre (Annexe 2).

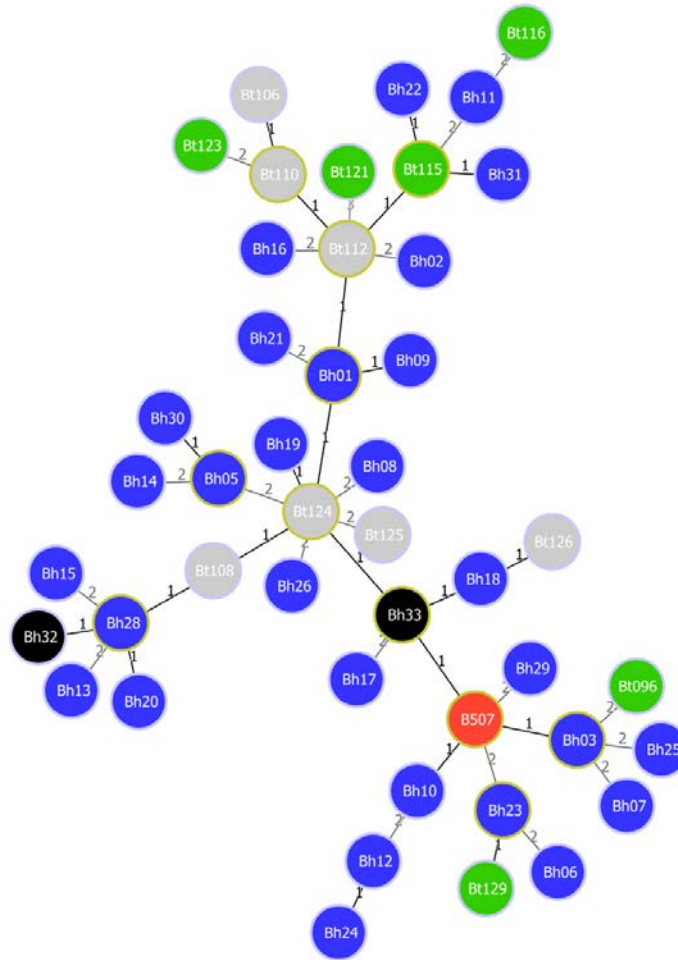


Figure 5 : Arbre de recouvrement minimal généré avec le logiciel PHYLOVIZ représentant les MLG de *Beauveria hoplocheli* sur la base de quatre loci microsatellites. Chaque cercle représente un MLG. Les chiffres indiquent le nombre de différences alléliques entre les MLG. Rouge : MLG B507, souche commerciale. Vert : MLG isolés dans les années 1987 à 1994 et retrouvés dans cette étude. Gris : MLG isolés dans les années 1987 à 1994 et non retrouvés dans cette étude. Bleu : MLG identifiés pour la première fois lors de cette étude. Noir : MLG retrouvés uniquement sur *H. marginalis*.

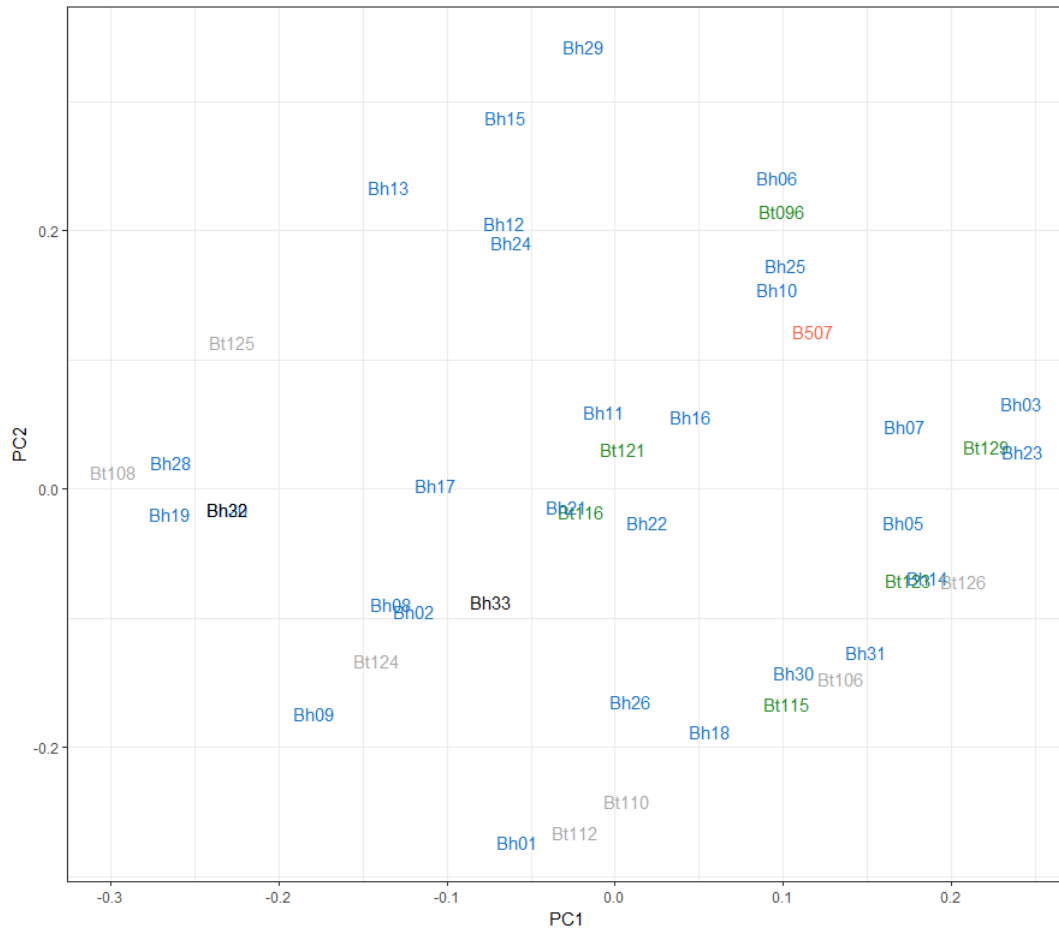


Figure 6 : ACP réalisées sur les MLG de *Beauveria hoplocheli* sur la base de quatre loci microsatellites. Rouge : MLG B507, souche commerciale. Vert : MLG isolés dans les années 1987 à 1994 et retrouvés dans cette étude. Gris : MLG isolés dans les années 1987 à 1994 et non retrouvés dans cette étude. Bleu : MLG identifiés pour la première fois lors de cette étude. Noir : MLG retrouvés uniquement sur *H. marginalis*.

L'analyse par clustering bayésien avec le logiciel STRUCTURE confirme l'absence de sous-groupe au sein de la population. La distribution de la probabilité moyenne L(K) ne varie pas en fonction de la valeur de K (Figure 7).

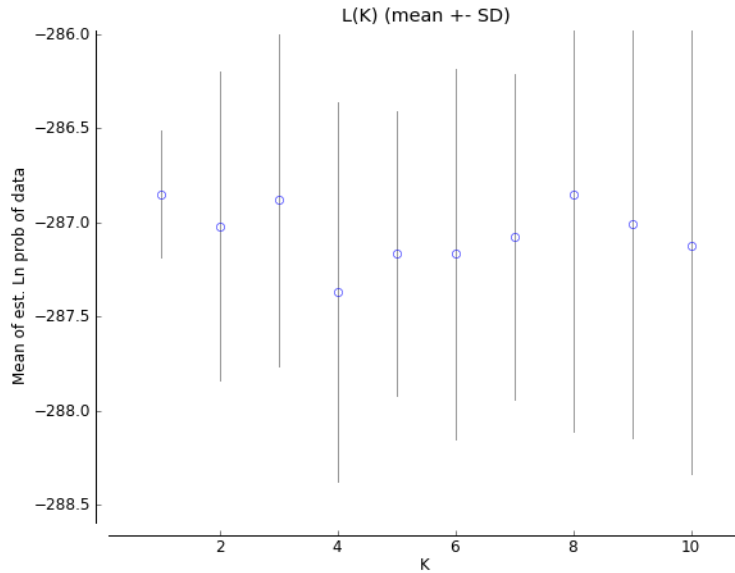


Figure 7 : Probabilité L(K) moyenne sur 20 runs en fonction du nombre de cluster K, pour les 36 MLG définis à partir de 4 loci.

Conclusion

Nous avons révélé une diversité de 36 MLG au sein de la population de *B. hoplocheli* dans les 18 parcelles de canne à sucre. La souche B507 est celle qui a été détectée dans le plus grand nombre de parcelles et d'échantillons de sol. Nous avons retrouvé six MLG correspondant à des souches de *B. hoplocheli* qui ont été isolées entre 1987 et 1993 à La Réunion ou à Madagascar sur *H. marginalis*. Ces souches ont très probablement été introduites au moment des premiers essais de lutte biologique à l'aide de *Beauveria* à La Réunion. Des larves de *H. marginalis* mycosées ont été ramenées de Madagascar en 1987 et utilisées pour contaminer des larves réunionnaises, introduites ensuite dans deux localités de l'Ouest de La Réunion (Vercambre, communication personnelle, 2008). La faible diversité génétique et l'absence de recombinaison dans la population indiquent que la diversité observée lors de cette étude ne résulte pas d'événements de reproduction sexuée. L'absence de groupe au sein de la population laisse penser que les souches proviennent d'une population homogène, qui a peu ou pas évolué. Il est possible que l'on retrouve aujourd'hui la diversité génétique qui a été introduite dans les années 1980 depuis Madagascar. Ces souches introduites ont pu se maintenir et se répandre dans l'ensemble de l'agrosystème canne à sucre réunionnais. Pour vérifier cette hypothèse, des prospections sont prévues à Madagascar, dans les localités où ont

Chapitre 3 – Diversité génétique de *B. hoplocheli*

été prélevées les larves mycosées d'origine. La diversité actuelle de *B. hoplocheli* infectant *H. marginalis* à Madagascar pourra être comparée à celle retrouvée à La Réunion.

Nous n'avons pas observé de modifications au niveau de la diversité génétique et de la fréquence relative de la souche commerciale B507 après la plantation de la canne à sucre et le traitement avec le produit Betel. Une étude quantitative est nécessaire pour compléter ce résultat. Il est possible que le délai de deux ans ne soit pas suffisamment long pour l'installation du champignon. La poursuite de l'étude donnera des réponses sur l'évolution des populations de *B. hoplocheli* à plus long terme. Cette étude sera aussi étendue à des parcelles non agricoles afin de savoir si le myco-insecticide s'est répandu dans d'autres écosystèmes.

Annexes

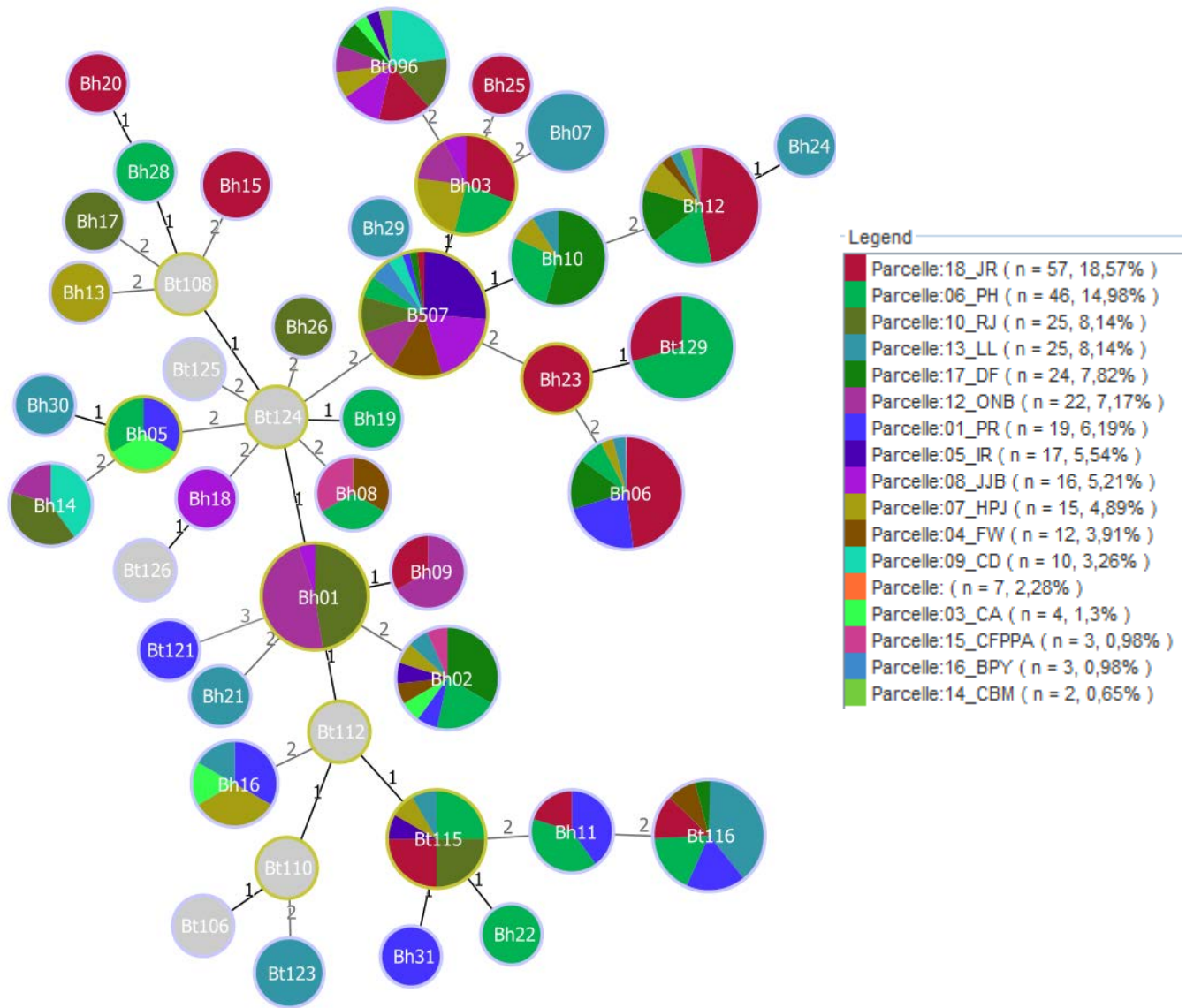
Annexe 1 : Liste des MLG de *Beauveria hoplocheli* identifiés en parcelles de canne à sucre et sur larves de *H. marginalis* avec le nombre de parcelles et d'échantillons dans lesquels chaque MLG a été détecté, ainsi que les années de détection. Les MLG soulignés ont été isolés entre 1987 et 1994.

T₀: MLG détecté avant plantation et traitement Betel ; T₁: MLG détecté l'année suivant la plantation et le traitement ; T₂: MLG détecté deux ans après la plantation et le traitement.

MLG	Nombre de parcelles	Nombre d'échantillons	T ₀	T ₁	T ₂	<i>H. marginalis</i>
B507	11	52	x	x	x	x
<u>Bt096</u>	10	26	x	x	x	x
Bh02	9	15	x	x	x	x
Bh12	8	36	x	x	x	x
<u>Bt115</u>	7	13	x	x	x	x
Bh06	6	31	x	x	x	x
<u>Bt116</u>	6	23	x	x	x	x
Bh03	6	14	x		x	x
Bh10	4	11	x	x	x	
Bh16	4	6	x	x		x
Bh01	3	19	x		x	x
Bh11	3	5	x	x		
Bh14	3	5	x	x		
Bh08	3	3	x	x		x
Bh05	3	3	x	x		
<u>Bt129</u>	2	18	x	x	x	x
Bh09	2	3	x			
Bh07	1	5	x		x	
<u>Bt123</u>	1	2	x	x		
Bh23	1	2	x	x		
Bh17	1	2	x		x	
Bh15	1	2	x			
Bh13	1	1	x			
Bh18	1	1	x			
Bh19	1	1	x			
Bh20	1	1	x			
Bh21	1	1	x			
Bh22	1	1	x			
Bh24	1	1	x			
<u>Bt121</u>	1	1		x		
Bh25	1	1		x		

Chapitre 3 – Diversité génétique de *B. hoplocheli*

Bh26	1	1		x	
Bh28	1	1		x	x
Bh29	1	1			x
Bh30	1	1			x
Bh31	1	1			x
Bh32	1				x
Bh33	1				x



Annexe 2 : Arbre de recouvrement minimal généré avec le logiciel PHYLOVIZ représentant les MLG de *Beauveria hoplocheli* sur la base de quatre loci microsattélites. Les couleurs représentent la proportion de ramets détectés dans chaque parcelle. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de ramets. Les chiffres indiquent le nombre de différences alléliques entre les MLG. Gris : MLG isolés dans les années 1987 à 1994 et non retrouvés dans cette étude.

Discussion générale

I. Elargissement des usages des souches homologuées de *B. bassiana*

1. Nouvelles cibles

L'espèce *B. bassiana* est connue pour avoir un très large spectre d'hôtes, mais une certaine spécificité peut exister à l'échelle de la souche (Goettel *et al.*, 1990; Zimmermann, 2007). Un certain nombre d'études montrent ainsi des différences de virulence entre souches de *B. bassiana*, qui sont parfois liées à des caractéristiques morphologiques ou physiologiques (Quesada-Moraga & Vey, 2003; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006; Valero-Jiménez *et al.*, 2014; Zare *et al.*, 2014). En testant deux souches de *B. bassiana*, I-2960 et I-2961, sur neuf espèces d'insectes, nous n'avons pas mis en évidence de différences de spectre d'hôtes physiologique entre ces deux souches tant au niveau de leur pathogénicité que de leur virulence. Cette absence de différence a été mise en évidence alors que ces deux souches ont été isolées sur des hôtes très différents et dans des régions éloignées. La souche I-2961 a été isolée sur le coléoptère *Cosmopolites sordidus* dans les Caraïbes et I-2960 sur le lépidoptère *Ostrinia nubilalis* en France métropolitaine.

L'étude du spectre d'hôtes physiologique a révélé de nouvelles cibles potentielles pour les souches I-2960 et I-2961. Nous avons montré que ces deux souches étaient pathogènes du coléoptère *Alphitobius diaperinus*, du lépidoptère *Galleria mellonella* et de six mouches des fruits de la famille des Tephritidae. Ces espèces peuvent être ajoutées à la liste des cibles connues des deux souches homologuées de *B. bassiana*. Elles sont toutes les deux autorisées contre le charançon rouge du palmier *Rhynchophorus ferrugineus* (European Food Safety Authority, 2015a, 2015b). La souche I-2961 est homologuée contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, notamment combinée à des pièges attractifs dans une stratégie d'auto-dissémination (European Food Safety Authority, 2015b). La souche I-2960 est pathogène des lépidoptères *Ostrinia nubilalis*, *Paysandisia archon* et *Thaumetopoea pityocampa* (Besse *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2013). Les deux souches peuvent être considérées comme généralistes, elles ont donc un bon potentiel pour contrôler de nombreux ravageurs. Il faudra

Discussion générale

néanmoins étudier leur spectre d'hôtes écologique une fois introduites, celui-ci étant différent du spectre d'hôtes physiologique (Hajek & Goettel, 2007).

L'efficacité des souches I-2960 et I-2961 semble en revanche restreinte sur le petit ténébrion *Alphitobius diaperinus*. Ce coléoptère est un ravageur des denrées stockées et des élevages de volailles, auxquelles il peut transmettre un grand nombre de pathogènes comme des salmonelles (Goodwin & Waltman, 1996; Roche *et al.*, 2009). Les souches I-2960 et I-2961 sont pathogènes pour les larves de cet insecte mais leur virulence est faible et nous n'avons pas observé de développement de mycose, il semble donc que le champignon ne soit pas capable de terminer son cycle sur cet hôte. (Geden *et al.*, 1998) ont montré que des larves, pupes et adultes de *A. diaperinus* étaient sensibles à quatre souches de *B. bassiana*, dont deux très virulentes, avec un développement externe de mycose. En revanche, lors d'essais en conditions naturelles, un ou deux traitements hebdomadaires avec *B. bassiana* n'ont pas été efficaces pour contrôler ce ravageur sur le long terme (Geden & Steinkraus, 2003). Des études complémentaires sont nécessaires pour sélectionner une souche de *B. bassiana* suffisamment virulente, de même qu'une formulation et une méthode d'application adaptées pour la lutte biologique contre ce ravageur.

2. L'auto-dissémination de *Beauveria* comme moyen de lutte contre les mouches des fruits

La démonstration de la forte virulence des souches I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* contre six espèces de mouches des fruits permet d'envisager leur utilisation pour lutter contre ces ravageurs, à condition de mettre au point une méthode d'application adaptée à la biologie de ces insectes. Nous avons étudié la faisabilité d'une méthode basée sur l'auto-dissémination de conidies de la souche I-2961 pour contrôler la mouche du melon *Z. cucurbitae*. L'objectif de cette méthode est d'utiliser les mâles adultes comme vecteurs du champignon, en les attirant dans un dispositif d'auto-contamination contenant des spores de *B. bassiana* pour qu'une fois contaminés, ils puissent sortir du dispositif et transmettre les conidies aux femelles lors de l'accouplement. Nous avons montré qu'une transmission de conidies avait lieu lorsqu'une mouche mâle contaminée par des conidies de *B. bassiana* était mise en contact avec une mouche femelle, qu'il y ait accouplement ou pas, mais que cette transmission était plus importante quand un accouplement avait lieu. La durée de vie des femelles accouplées a été réduite de moitié, de 29 à 15 jours, alors que les femelles non accouplées en contact avec un

Discussion générale

mâle contaminé survivaient en moyenne 23 jours après la mise en contact. La période de ponte des femelles survenant entre 10 et 15 jours après l'accouplement (Mir *et al.*, 2014), une partie des femelles sera tuée avant d'avoir pu pondre. Il est également possible que la fécondité des femelles soient affectée par l'infection du champignon avant leur mort (Dimbi *et al.*, 2013; Sookar *et al.*, 2014). (Sookar *et al.*, 2014) ont pu mettre en évidence une baisse de moitié de la fécondité sur sept jours après contamination par *M. anisopliae* de femelles *Z. cucurbitae*, que la contamination soit directe ou par l'intermédiaire de mâles contaminés. Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser l'impact de la contamination des femelles par les spores de la souche I-2961 sur leur fécondité, à mettre notamment en relation avec la quantité de spores présentes sur la femelle.

Nous avons montré qu'une contamination par simple contact avec une mouche contaminée était possible, ce qui pourra en conditions réelles amplifier la dissémination du champignon dans la population de *Z. cucurbitae*. Les mâles contaminés pourront transmettre des conidies non seulement aux femelles par accouplement ou par contact durant la parade sexuelle (Suzuki & Koyama, 1981), mais aussi aux autres mâles au sein des regroupements appelés leks (Iwahashi & Majima, 1986). Notre dispositif expérimental a révélé une possibilité de contamination des femelles sans contact direct avec un mâle contaminé, mais par les conidies déposées par le mâle dans l'enceinte d'accouplement. Cette faculté pourrait permettre d'atteindre davantage d'individus en champ, en amenant une petite quantité d'inoculum dans l'habitat précis des mouches des fruits adultes. Cette contamination devra en revanche être prise en compte dans toutes les expérimentations qui pourront être réalisées par la suite.

Dans notre étude, la quantité de conidies disponibles pour transmission sur les mâles n'était plus suffisante au bout de 24 h pour causer une augmentation de la mortalité des femelles. Cette diminution rapide de conidies disponibles peut être liée au comportement de grooming que nous avons observé chez les mâles après leur contamination et qui a été rapporté également par Dimbi *et al.* (2013). Elle est aussi probablement due à la germination rapide des conidies sur la cuticule de l'insecte, qui a lieu d'après Robinson (1966) entre 12 et 18 h après contact avec la cuticule. Nous avons mesuré un taux de germination de 84 % après 24 h pour la souche I-2961 sur milieu PDA. La mortalité des femelles dépend de la quantité de conidies transmise par le mâle (Ekesi *et al.*, 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2006b), il est donc important pour l'efficacité de la méthode que le mâle capte une quantité maximale de spores lors de sa contamination dans le dispositif et que ces spores soient transmissibles facilement et

Discussion générale

durablement à la femelle. Le développement d'une formulation adaptée de conidies est donc primordial. Certaines poudres électrostatiques peuvent améliorer l'adhésion des conidies sur l'insecte tout en permettant leur transmission horizontale pendant l'accouplement (Barton *et al.*, 2006).

Si la période de disponibilité des conidies sur le mâle peut être allongée, celui-ci disposera de plusieurs jours pour contaminer une ou plusieurs femelles. Lors de nos expériences, les mâles contaminés commençaient à mourir au bout de cinq jours. Les symptômes d'une infection par un champignon entomopathogène apparaissent en général tardivement, quelques heures avant la mort (Dimbi *et al.*, 2009). La contamination des mâles par la souche I-2961 n'a pas affecté leur taux d'accouplement, même au bout de 24 h. En revanche, des tests supplémentaires avec choix des partenaires sont nécessaires pour s'assurer que la femelle ne choisit pas préférentiellement un mâle non contaminé ou si les mâles non contaminés ne sont pas plus compétitifs que des mâles contaminés.

Notre étude en laboratoire devra être suivie par des expérimentations sur le terrain. La conception du dispositif d'attraction et d'auto-contamination sera cruciale pour le succès de la stratégie. Les conidies de *B. bassiana* devront être facilement accessibles pour les mouches tout en étant protégées du soleil, du vent et de la pluie à l'intérieur du dispositif. Il faudra mesurer l'évolution de leur viabilité au cours du temps afin de déterminer la durée optimale au bout de laquelle les conidies devront être renouvelées. Il est aussi important que les mâles attirés dans le dispositif puissent en sortir facilement une fois contaminés. Nous avons effectué un premier test avec un prototype de dispositif : un piège TephriTrap que nous avons modifié pour augmenter le nombre d'ouvertures permettant aux mouches de ressortir facilement. Nous y avons placé un petit morceau de plastique imprégné d'un attractif, le cue-lure, et des conidies formulées de I-2961. Nous avons observé que les mouches mâles pénétraient dans le dispositif, se contaminaient puis en ressortaient au bout de quelques heures. Le choix de l'attractif ainsi que son placement dans le dispositif doivent être réfléchis car certaines molécules inhibent la germination des champignons entomopathogènes (Mfuti *et al.*, 2016) et une séparation spatiale de l'attractif et des conidies est parfois nécessaire (Mfuti *et al.*, 2015). Nous n'avons pas mis en évidence de différence de taux de germination des conidies de la souche I-2961 en absence ou en présence de cue-lure lors de tests préliminaires.

Discussion générale

Des expérimentations en champ avec la souche I-2961 impliqueraient l'introduction de cette souche dans l'environnement réunionnais. Or, d'une part, les résultats du chapitre 1 démontrent que la souche I-2961 possède un spectre large et très peu de spécificité d'hôte. D'autre part, les résultats du chapitre 3 suggèrent qu'une fois introduites, les souches de tels champignons entomopathogènes ont la capacité de se maintenir et se répandre dans l'environnement. L'introduction d'une nouvelle souche comme I-2961 à La Réunion pourrait par conséquent avoir des effets indésirables. Il est donc envisagé de mener la suite des expérimentations avec la souche de *B. hoplocheli* utilisée dans le Betel, qui est pathogène des mouches des fruits. Cette souche a été largement disséminée dans les agrosystèmes canniers depuis plusieurs décennies et son extension d'usage aux mouches des fruits ne pose pas de problème de biosécurité particulier.

II. Lutte contre *H. marginalis* à La Réunion

Le champignon *B. hoplocheli* est utilisé depuis une trentaine d'années à La Réunion pour lutter contre le ver blanc *H. marginalis*. Ce ravageur est un organisme réglementé qui fait l'objet d'une lutte obligatoire par arrêté préfectoral, avec le produit Betel contenant le champignon *B. hoplocheli*. Cette spécialité est aujourd'hui le seul insecticide autorisé pour lutter contre *H. marginalis*, mais elle n'est plus homologuée et bénéficie d'une dérogation ministérielle. En l'absence d'homologation du produit et de solution pérenne, il est important d'envisager des solutions alternatives et de se poser la question du devenir du champignon en champ de canne si les traitements étaient arrêtés.

Nous avons montré que les souches homologuées I-2960 et I-2961 de *B. bassiana* ne pouvaient pas être utilisées pour remplacer la souche B507 car elles ne sont pas pathogènes pour *H. marginalis*. Lors d'études précédentes, seules les souches de *Beauveria* sp. isolées de *H. marginalis* étaient pathogènes de cet insecte (Neuvéglise *et al.*, 1997; Neuvéglise *et al.*, 1994). Ces souches ont été classées par la suite dans l'espèce *B. hoplocheli* (Robène-Soustrade *et al.*, 2015). Parmi la vingtaine de souches de *B. brongniartii* testées par Neuvéglise *et al.* (1994), aucune n'a montré d'effet sur la mortalité des larves de *H. marginalis*. *Beauveria hoplocheli* reste par conséquent le seul entomopathogène disponible sur le marché dont la pathogénicité contre *H. marginalis* est démontrée.

Discussion générale

Cette thèse apporte des éléments de réponse quant à l'évolution des populations de *B. hoplocheli* en champ de canne à sucre en cas d'interruption du traitement Betel. Nous avons détecté le champignon *B. hoplocheli* dans la quasi-totalité des parcelles de canne à sucre étudiées (17 sur 18) avant la replantation et le traitement Betel, même dans les parcelles qui n'avaient pas été traitées depuis plus de 20 ans. *Beauveria hoplocheli* est donc capable de persister très longtemps dans le sol. Nous n'avons pas pu corrélérer cette persistance à la présence de l'hôte *H. marginalis*, mais nous avons observé très peu de larves lors de l'échantillonnage. Nous avons détecté une diversité de 36 MLG au sein de la population de *B. hoplocheli* dans les parcelles de canne à sucre, dont 13 ont été retrouvées sur vers blancs, en plus de la souche B507 du Betel. Parmi ces génotypes, six correspondaient à des souches de *B. hoplocheli* qui ont été isolées entre 1987 et 1993 à La Réunion ou à Madagascar sur *H. marginalis*. Nous n'avons pas détecté de groupes au sein de la population. La faible diversité génétique et l'absence de recombinaison dans la population indiquent que la diversité observée ne résulte pas d'événements de reproduction sexuée. Il est possible que la diversité des souches retrouvées soit une image de la diversité introduite dans années 1980 lors de la mise en place de la lutte biologique contre *H. marginalis*. Cette hypothèse devra être vérifiée par un échantillonnage dans les régions de Madagascar où ont été prélevées les larves de *H. marginalis* mycosées en 1987. Cela permettra de comparer la diversité génétique actuelle dans la zone d'origine des *B. hoplocheli* avec celle observée dans la zone d'introduction à La Réunion. Il semble que les souches introduites de *B. hoplocheli* se soient acclimatées et répandues dans l'ensemble de l'agrosystème canne à sucre, comme dans le cas d'une lutte biologique classique. Certaines de ces souches sont pathogènes de *H. marginalis*, il est donc probable qu'elles participent au contrôle à long terme de ce ver blanc. Il serait intéressant d'évaluer le pouvoir pathogène des différentes souches de *B. hoplocheli* sur ce ravageur. La persistance à long terme de ces souches dans les sols est cohérente avec la capacité des champignons du genre *Beauveria* à se développer comme des saprophytes (Jaronski, 2007). Il est également possible qu'il y ait d'autres hôtes que *H. marginalis* dans le sol. Notre étude n'a pas permis d'observer un effet de l'épandage du Betel sur la diversité génétique et de la fréquence relative de la souche commerciale B507 sur le court terme (deux ans). La poursuite de l'étude permettra de mesurer l'évolution des populations de *B. hoplocheli* sur plusieurs années après le traitement.

La mise en place d'un réseau de parcelles pour étudier la durabilité de la lutte biologique contre *H. marginalis* à La Réunion a permis un suivi de la souche commerciale et des

Discussion générale

populations de *B. hoplocheli* avant et après plantation de la canne à sucre, et il est prévu de poursuivre ce suivi jusqu'à cinq ans post-traitement. Nous avons pu évaluer l'évolution des populations d'un point de vue qualitatif en étudiant la diversité génétique. Le suivi quantitatif des populations de *B. hoplocheli* et des autres *Beauveria* spp. permettra d'acquérir des connaissances plus approfondies sur l'effet du traitement Betel sur l'abondance des *Beauveria* spp. dans le sol et sur la persistance du champignon. Cette étude quantitative faisait partie des objectifs initiaux de la thèse. Nous avons pour cela utilisé différentes techniques pour isoler et détecter ces champignons entomopathogènes du sol.

La première méthode était basée sur la PCR diagnostique des *Beauveria* spp. directement sur l'ADN total extrait des échantillons de sol. A cause de la faible quantité d'ADN de *Beauveria* spp. présente dans ces échantillons et des possibles contaminants, il a été nécessaire de réaliser deux amplifications PCR successives, dites « nested PCR ». Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR (Thomsen & Jensen, 2002), mais augmente aussi les risques de faux-positifs. En raison de problèmes de contamination et de difficultés pour fixer une limite de détection de *Beauveria* spp., nous n'avons pas encore pu exploiter ces résultats, mais les travaux sont en cours. Le développement d'une PCR quantitative (qPCR) basée sur le gène *Pr1* a également été envisagé pour quantifier précisément l'ADN de champignon extrait du sol.

La seconde méthode quantitative a reposé sur des étalements d'échantillons de sol issus des prélèvements à T₀ sur un milieu semi-sélectif développé spécifiquement pour le genre *Beauveria* (Meyling, 2007). Il contient des antibactériens et des antifongiques qui inhibent le développement des basidiomycètes. L'objectif était de dénombrer les colonies de *Beauveria* spp. au bout de quelques jours de culture. Nous avons constaté lors des premières expérimentations que les critères morphologiques n'étaient pas suffisants pour distinguer les jeunes colonies du genre *Beauveria* des autres champignons entomopathogènes ascomycètes qui poussaient aussi sur le milieu semi-sélectif. Pour pouvoir quantifier les *Beauveria* spp., en particulier l'espèce *B. hoplocheli* utilisée en lutte biologique, il est nécessaire de développer une méthode permettant l'identification rapide et peu coûteuse des jeunes colonies fongiques. La technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) possède ce potentiel. Elle est utilisée en routine dans le milieu médical pour l'identification des bactéries (Wieser *et al.*, 2012) et a déjà montré son utilité pour l'identification rapide à faible coût de champignons (Chalupová *et al.*, 2014; Ranque *et al.*, 2014), y compris le champignon entomopathogène *Metarhizium* spp. (Lopes *et al.*, 2014a). Elle utilise un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée

Discussion générale

par une matrice et un analyseur à temps de vol. Cette méthode peut être utilisée directement sur une culture ou après une simple extraction protéique. Nous avons commencé la mise au point de la méthode pour l'identification des *Beauveria* spp. au cours de la thèse avec l'encadrement de deux stages sur le sujet. Une base de données de spectre MALDI-TOF a été réalisée pour les espèces de *Beauveria* et quelques espèces composant la microflore du sol isolée sur milieu semi-sélectif. La méthode semble adaptée pour discriminer les *Beauveria* spp. des autres champignons du sol. La suite du projet nécessitera une évaluation de son efficacité sur des isollements du terrain.

Les nouvelles technologies de séquençage à haut débit permettent des approches puissantes de métabarcoding, pour identifier simultanément de nombreux taxons dans un échantillon environnemental (Taberlet *et al.*, 2012). Une des perspectives de cette thèse est d'utiliser la stratégie de métabarcoding pour caractériser la diversité taxonomique des communautés fongiques de l'agrosystème cultivé et évaluer l'impact du traitement myco-insecticide sur celle-ci. Cette approche permettrait également d'étudier les communautés fongiques, et notamment les entomopathogènes, dans les écosystèmes naturels de l'île et de les comparer avec celles de l'agrosystème canne à sucre. La région ITS est généralement utilisée comme marqueur dans les études de métabarcoding des communautés fongiques car elle permet d'identifier un large spectre de champignons tout en ayant un niveau suffisant de variation interspécifique (Schoch *et al.*, 2012). La diversité de communautés fongiques du sol a été étudiée par métabarcoding dans les sols de forêts françaises (Buée *et al.*, 2009), dans différents écosystèmes en France et en Italie (Orgiazzi *et al.*, 2013), dans des forêts boréales (Clemmensen *et al.*, 2013) et tropicales (Kemler *et al.*, 2013; McGuire *et al.*, 2013) ou encore dans l'île tropicale de Puerto Rico (Urbina *et al.*, 2015). Cette stratégie a également été utilisée pour évaluer l'effet de l'introduction d'une souche de *B. bassiana* sur la diversité de la communauté fongique indigène (Hirsch *et al.*, 2013).

Discussion générale

Références bibliographiques

- Agapow, P. M., & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2), 101-102.
- Agrawal, Y., Mual, P., & Shenoy, B. (2014). Multi-gene genealogies reveal cryptic species *Beauveria rudraprayagi* sp nov from India. *MYCOSPHERE*, 5(6), 719-736.
- Agreste. (2011). *La canne à sucre reste le pilier de l'agriculture réunionnaise*.
- Agreste. (2013). *Memento 2013 agricole et rural, La statistique agricole*.
- Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, J. R., & Howard, R. W. (2004). Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *Journal of Economic Entomology*, 97(2), 273-280.
- Al-mazra'awi, M. S., Shipp, J. L., Broadbent, A. B., & Kevan, P. G. (2006a). Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. *Environmental Entomology*, 35(6), 1569-1577.
- Al-mazra'awi, M. S., Shipp, L., Broadbent, B., & Kevan, P. (2006b). Biological control of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. *Biological Control*, 37(1), 89-97.
- Andersen, S. O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of Entomology*, 24(1), 29-59.
- Aquino de Muro, M., Mehta, S., & Moore, D. (2003). The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 249-257.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., & Serrao, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16(24), 5115-5139.
- Avery, P. B., Hunter, W. B., Hall, D. G., Jackson, M. A., Powell, C. A., & Rogers, M. E. (2009). *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) Infection and Dissemination of the Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) Under Laboratory Conditions. *Florida Entomologist*, 92(4), 608-618.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., & St. Leger, R. J. (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324, 159-169.

- Bailleul, D., Stoeckel, S., & Arnaud-Haond, S. (2016). RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(8), 966-970.
- Baker, D. K., Rice, S. J., Leemon, D. M., & James, P. J. (2017). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitacea) and the effects of infection on oviposition rate in laboratory populations of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*.
- Bartlett, M. C., & Jaronski, S. T. (1988). Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In M. N. Burge (Ed.), *Fungi in biological control systems* (pp. 61-85). Manchester, UK: Manchester University Press.
- Barton, L., Armsworth, C., Baxter, I., Poppy, G., Gaunt, L., & Nansen, C. (2006). Adhesive powder uptake and transfer by Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 130(5), 257-262.
- Baxter, I. H., Howard, N., Armsworth, C. G., Barton, L. E., & Jackson, C. (2008). The potential of two electrostatic powders as the basis for an autodissemination control method of *Plodia interpunctella* (Hübner). *Journal of Stored Products Research*, 44(2), 152-161.
- Behle, R. W., Compton, D. L., Laszlo, J. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2009). Evaluation of soyscreen in an oil-based formulation for UV protection of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of Economic Entomology*, 102(5), 1759-1766.
- Bernardo, C. C., Barreto, L. P., e Silva, C. d. S. R., Luz, C., Arruda, W., & Fernandes, É. K. K. (2018). Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(5), 1334-1342.
- Berretta, M. F., Lecuona, R. E., Zandomeni, R. O., & Grau, O. (1998). Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(2), 145-150.
- Besse, S., Bonhomme, A., & Panchaud, K. (2008). *Preventive and curative efficacy of Ostrinil®, a Beauveria bassiana spores based microgranule formulation, against the Castniid palm borer Paysandisia archon (Burmeister, 1880)*. Paper presented at the 3rd Annual Biocontrol Industry Meeting, Lucerne, Switzerland.
- Besse, S., Crabos, L., & Panchaud, K. (2013). *Le champignon Beauveria bassiana: une solution biologique contre le charançon rouge du palmier - Résultats d'efficacité de*

- deux souches en France et en Espagne*. Paper presented at the AFPP – Colloque méditerranéen sur les ravageurs des palmiers, Nice.
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., & De Croos, J. N. (2001). Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1335-1342.
- Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1990). Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(3), 362-370.
- Bidochka, M. J., McDonald, M. A., St. Leger, R. J., & Roberts, D. W. (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, 25(2), 107-113.
- Bidochka, M. J., Menzies, F. V., & Kamp, A. M. (2002). Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology*, 178(6), 531-537.
- Bing, L. A., & Lewis, L. C. (1991). Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner)(Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology*, 20(4), 1207-1211.
- Bing, L. A., & Lewis, L. C. (1993). Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 45(1), 147-156.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., 2nd, Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., Schadt, C. W., & Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*, 23(13), 3356-3370.
- Bonnet, C., Martin, J., Mazet, R., Correard, M., & Besse, S. (2013). *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv) Vuillemin: an entomopathogen to reduce the expansion of the pine processionary plants transported by container. Paper presented at the 3e Conférence sur l'entretien des Zones Non Agricoles, Toulouse, France.

- Boomsma, J. J., Jensen, A. B., Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2014). Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*, 59, 467-485.
- Bos, N., Sundstrom, L., Fuchs, S., & Freitak, D. (2015). Ants medicate to fight disease. *Evolution*, 69(11), 2979-2984.
- Boucias, D. G., & Pendland, J. C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. In G. T. Cole & H. C. Hoch (Eds.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 101-127). New York, USA: Springer.
- Bricca, E. S., Nibouche, S., Delatte, H., Normand, F., & Amouroux, P. (2014). Test of the pathogenicity of two commercial *Beauveria* strains on third-instar larvae of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt)(Diptera: Cecidomyiidae). *Fruits*, 69(3), 189-194.
- Brodeur, J. (2012). Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*, 5(5), 470-480.
- Brown, A., Feldman, M., & Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 96(2), 523-536.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184(2), 449-456.
- Butt, T., Carreck, N., Ibrahim, L., & Williams, I. (1998). Honey-bee-mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 8(4), 533-538.
- Butt, T., Coates, C., Dubovskiy, I., & Ratcliffe, N. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Advances in Genetics*.
- Butt, T., & Goettel, M. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (pp. 141). Wallingford, UK: CAB International.
- Butt, T. M., Ibrahim, L., Clark, S. J., & Beckett, A. (1995). The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research*, 99(8), 945-950.
- Carneiro, A. A., Gomes, E. A., Guimarães, C. T., Fernandes, F. T., Carneiro, N. P., & Cruz, I. (2008). Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(4), 513-520.

- Castrillo, L. A., & Brooks, W. M. (1998). Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(3), 190-196.
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., & Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32(1), 230-241.
- Charlery de la Masselière, M., Ravigné, V., Facon, B., Lefeuvre, P., Massol, F., Quilici, S., & Duyck, P.-F. (2017). Changes in phytophagous insect host ranges following the invasion of their community: Long-term data for fruit flies. *Ecology and Evolution*, 7(9), 10.
- Chen, M.-j., Huang, B., Li, Z.-z., & Spatafora, J. W. (2013). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria sinensis* sp. nov. from China. *Mycotaxon*, 124(1), 301-308.
- Cherry, A. J., Banito, A., Djegui, D., & Lomer, C. (2004). Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 67-73.
- Christenson, L., & Foote, R. H. (1960). Biology of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 5(1), 171-192.
- Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5), 197-203.
- Clemmensen, K., Bahr, A., Ovaskainen, O., Dahlberg, A., Ekblad, A., Wallander, H., Stenlid, J., Finlay, R., Wardle, D., & Lindahl, B. (2013). Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science*, 339(6127), 1615-1618.
- Coates, B. S., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (2002a). Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45(1), 125-132.
- Coates, B. S., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (2002b). *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. *Mycological Research*, 106(01), 40-50.
- Cravanzola, F., Piatti, P., Bridge, P., & Ozino, O. (1997). Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 289-294.

- CTICS. (2015). *Campagne sucrière 2015*: Centre technique interprofessionnel de la canne et du sucre de la Réunion.
- De la Rosa, W., Lopez, F., & Liedo, P. (2002). *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 36-43.
- De Meyer, M., Delatte, H., Nwatawala, M., Quilici, S., Vayssieres, J., & Virgilio, M. (2015). A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)(Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*.
- de Oliveira, D. G. P., Lopes, R. B., Rezende, J. M., & Delalibera Jr, I. (2018). Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- de Roode, J. C., & Lefèvre, T. (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3), 789-820.
- Dimbi, S., Maniania, N., & Ekesi, S. (2013). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. *Insects*, 4(2), 206-216.
- Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2009). Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. *Biological Control*, 50(2), 111-116.
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, 156(4), 375-382.
- Direction de l'alimentation, d. l. a. e. d. l. f. d. L. R. (2016). COROSSOL - Base agricole de l'Occupation du Sol (BOS).
- Donga, T. K., Vega, F. E., & Klingen, I. (2018). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. *Fungal Ecology*, 35, 70-77.
- Dupuis, J. R., Roe, A. D., & Sperling, F. A. H. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular Ecology*, 21(18), 4422-4436.

- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400.
- Ekesi, S., Dimbi, S., & Maniania, N. (2007). The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In S. Ekesi & N. K. Maniania (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management* (pp. 239-274).
- Ekesi, S., Maniania, N., & Lux, S. (2002). Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 12(1), 7-17.
- Ekesi, S., Shah, P. A., Clark, S. J., & Pell, J. K. (2005). Conservation biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agricultural and Forest Entomology*, 7(1), 21-30.
- Enkerli, J., Widmer, F., Gessler, C., & Keller, S. (2001). Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycological Research*, 105(9), 1079-1087.
- Enkerli, J., Widmer, F., & Keller, S. (2004). Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biological Control*, 29(1), 115-123.
- European Food Safety Authority. (2015a). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Beauveria bassiana* strain 147. *EFSA Journal*, 13(10), 4261.
- European Food Safety Authority. (2015b). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Beauveria bassiana* strain NPP111B005. *EFSA Journal*, 13(10), 4264.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Evans, C. J., & Banerjee, U. (2003). Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 30(2), 223-228.
- Fargues, J., Goettel, M., Smits, N., Ouedraogo, A., & Rougier, M. (1997). Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 383-392.

- Fargues, J., & Remaudiere, G. (1977). Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, 62(1), 31-37.
- Faria, M. R. d., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.
- Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11365-11370.
- Fernandes, E. K., Moraes, A. M., Pacheco, R. S., Rangel, D. E., Miller, M. P., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2009). Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 760-774.
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E., Moraes, A. M., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(3), 237-243.
- Furlong, M. J., Pell, J. K., Choo, O. P., & Rahman, S. A. (1995). Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Bulletin of Entomological Research*, 85(3), 331-337.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S.-H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X.-Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L.-J., St. Leger, R. J., Zhao, G.-P., Pei, Y., Feng, M.-G., Xia, Y., & Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, 7(1), e1001264.
- Geden, C., Arends, J., Rutz, D., & Steinkraus, D. (1998). Laboratory Evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in Poultry Litter, Soil, and a Pupal Trap. *Biological Control*, 13(2), 71-77.
- Geden, C. J., & Steinkraus, D. C. (2003). Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1602-1607.

- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, *30*(5), 250-258.
- Goettel, M., Poprawski, T., Vandenberg, J., Li, Z., & Roberts, D. (1990). Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In M. Laird, L. Lacey, & E. Davidson (Eds.), *Safety of microbial insecticides* (pp. 209-229): CRC Press.
- Goettel, M. S., St. Leger, R. J., Rizzo, N. W., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1989). Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology*, *135*(8), 2233-2239.
- Goodwin, M. A., & Waltman, W. D. (1996). Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *The Journal of Applied Poultry Research*, *5*(1), 51-55.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A. A., Reichhart, J.-M., Wang, C., Butt, T. M., Belvin, M., Hoffmann, J. A., & Ferrandon, D. (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, *127*(7), 1425-1437.
- Greenfield, B. P., Lord, A. M., Dudley, E., & Butt, T. M. (2014). Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *Royal Society Open Science*, *1*(2), 140193.
- Hajek, A., Huang, B., Dubois 1, T., Smith, M., & Li, Z. (2006). Field studies of control of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, *16*(4), 329-343.
- Hajek, A. E. (1997). Ecology of terrestrial fungal entomopathogens *Advances in Microbial Ecology* (pp. 193-249): Springer.
- Hajek, A. E., & Delalibera, I. (2010). Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl*, *55*(1), 147-158.
- Hajek, A. E., Elkinton, J. S., & Witcosky, J. J. (1996). Introduction and spread of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) along the leading edge of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) spread. *Environmental Entomology*, *25*(5), 1235-1247.

- Hajek, A. E., Gardescu, S., & Delalibera Jr., I. (2016). *Classical biological control of insects and mites: a worldwide catalogue of pathogen and nematode introductions* (Vol. 2016-06). Morgantown, WV: FHTET, USDA Forest Service.
- Hajek, A. E., & Goettel, M. S. (2007). Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms. In L. A. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 816-833). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293-322.
- Hallsworth, J. E., & Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3), 261-266.
- Hawksworth, D. L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus*, 2(2), 155.
- Herth. (2011). *Le bio-contrôle pour la protection des cultures, 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes*.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y.-J., & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hirsch, J., Galidevara, S., Strohmeier, S., Uma Devi, K., & Reineke, A. (2013). Effects on diversity of soil fungal community and fate of an artificially applied *Beauveria bassiana* strain assessed through 454 pyrosequencing. *Microbial Ecology*, 66(3), 608-620.

- Hokkanen, H. M. T., Zeng, Q.-Q., & Menzler-Hokkanen, I. (2003). Assessing the Impacts of *Metarhizium* and *Beauveria* on Bumblebees. In H. M. T. Hokkanen & A. E. Hajek (Eds.), *Environmental impacts of microbial insecticides: need and methods for risk assessment* (pp. 63-71). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., Liu, X., Zhan, S., Leger, R. J. S., & Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16796-16801.
- Humber, R. A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(3), 262-266.
- Hummel, R. L., Walgenbach, J. F., Barbercheck, M. E., Kennedy, G. G., Hoyt, G. D., & Arellano, C. (2002). Effects of production practices on soil-borne entomopathogens in western North Carolina vegetable systems. *Environmental Entomology*, *31*(1), 84-91.
- Hyde, K., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, *33*(163173), 2.
- Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., & Yao, Y.-J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *20*, 1204-1212.
- Imoulan, A., Wu, H.-J., Lu, W.-L., Li, Y., Li, B.-B., Yang, R.-H., Wang, W.-J., Wang, X.-L., Kirk, P. M., & Yao, Y.-J. (2016). *Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 23-69). Wallingford, UK: CAB International.
- Iwahashi, O., & Majima, T. (1986). Lek formation and male-male competition in the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, *21*(1), 70-75.
- Jabbour, R., & Barbercheck, M. E. (2009). Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control*, *51*(3), 435-443.

- Jackson, M. A., Cliquet, S., & Iten, L. B. (2003). Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*, *13*(1), 23-33.
- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, *55*(1), 129-145.
- Jaronski, S. T. (2007). Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. In S. Ekesi & N. K. Maniania (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management* (pp. 91-144).
- Jensen, A. B., Thomsen, L., & Eilenberg, J. (2006). Value of host range, morphological, and genetic characteristics within the *Entomophthora muscae* species complex. *Mycological Research*, *110*(8), 941-950.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, *2*, e281.
- Kapongo, J. P., Shipp, L., Kevan, P., & Broadbent, B. (2008). Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. *BioControl*, *53*(5), 797-812.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., & Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649.
- Keller, S. (2000). Use of *Beauveria brongniartii* in Switzerland and its acceptance by farmers. *Bulletin OILB/SROP*, *23*(8), 67-71.
- Keller, S., Kessler, P., & Schweizer, C. (2003). Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *BioControl*, *48*(3), 307-319.
- Keller, S., & Zimmermann, G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In N. Wilding, N. M. Collins, P. M. Hammond, & J. F. Webber (Eds.), *Insect-Fungus Interactions* (pp. 239-270). London: Academic Press.
- Kemler, M., Garnas, J., Wingfield, M. J., Gryzenhout, M., Pillay, K.-A., & Slippers, B. (2013). Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. *PLoS One*, *8*(12), e81718.

- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., & Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, *106*(4), 811-829.
- Kepler, R. M., Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G.-H., Rehner, S. A., Aime, M. C., Henkel, T. W., Sanjuan, T., & Zare, R. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus*, *8*(2), 335-353.
- Kepler, R. M., Ugine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A., & Rehner, S. A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental Microbiology*, *17*(8), 2791-2804.
- Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E., & Charnley, A. K. (1999). The Role of Destruxins in the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for Three Species of Insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, *74*(3), 213-223.
- Kirkland, B. H., Westwood, G. S., & Keyhani, N. O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, *41*(4), 705-711.
- Klein, M. G., & Lacey, L. A. (1999). An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the Japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, *9*(2), 151-158.
- Klingen, I., Eilenberg, J., & Meadow, R. (2002). Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *91*(1), 191-198.
- Klingen, I., & Haukeland, S. (2006). The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In J. Eilenberg & H. M. T. Hokkanen (Eds.), *An ecological and societal approach to biological control* (pp. 145-211): Springer.
- Köljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., & Callaghan, T. M. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, *22*(21), 5271-5277.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., & Vaupel, O. (2004). Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips*

- typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14(8), 837-848.
- Laengle, T., & Strasser, H. (2010). Developing a risk indicator to comparatively assess environmental risks posed by microbial and conventional pest control agents. *Biocontrol Science and Technology*, 20(7), 659-681.
- Leatherdale, D. (1970). The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain. *BioControl*, 15(4), 419-435.
- Leger, S., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W., & Roberts, D. W. (1996). Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 907-912.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14614-14619.
- Li, Z. (1988). A list of insect hosts of *Beauveria bassiana*. *Study and application of entomogenous fungi in China*, 1, 241-255.
- Li, Z., Li, C., Huang, B., & Fan, M. (2001). Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chinese Science Bulletin*, 46(9), 751-753.
- Lingg, A. J., & Donaldson, M. D. (1981). Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(2), 191-200.
- Lomer, C., Bateman, R., Johnson, D., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46, 667-702.
- Lopes, R. B., Faria, M., Souza, D. A., Bloch, C., Silva, L. P., & Humber, R. A. (2014a). MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia*, 106(4), 865-878.
- Lopes, R. B., Laumann, R. A., Moore, D., Oliveira, M. W., & Faria, M. (2014b). Combination of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in an attract-and-kill strategy against the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(1), 75-85.

- Lopes, R. B., Michereff-Filho, M., Tigano, M. S., Neves, P., Lopez, E. L., Fancelli, M., & da Silva, J. P. (2011a). Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. *Bulletin of Insectology*, *64*(2), 201-208.
- Lopes, R. B., Pauli, G., Mascarin, G. M., & Faria, M. (2011b). Protection of entomopathogenic conidia against chemical fungicides afforded by an oil-based formulation. *Biocontrol Science and Technology*, *21*(2), 125-137.
- Lu, H.-L., & St. Leger, R. (2016). Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Advances in Genetics*, *94*, 251-285.
- Lu, H.-L., Wang, J. B., Brown, M. A., Euerle, C., & St. Leger, R. J. (2015). Identification of *Drosophila* Mutants Affecting Defense to an Entomopathogenic Fungus. *Scientific Reports*, *5*, 12350.
- Maniania, N. K. (2002). A low-cost contamination device for infecting adult tsetse flies, *Glossina* spp., with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the field. *Biocontrol Science and Technology*, *12*(1), 59-66.
- Maniania, N. K., Okech, M. A., Adino, J. O., Opere, J. O., & Ekesi, S. (2013). Transfer of inoculum of *Metarhizium anisopliae* between adult *Glossina morsitans morsitans* and effects of fungal infection on blood feeding and mating behaviors. *Journal of Pest Science*, *86*(2), 285-292.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(11), 177.
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard, P., Bridge, P., & Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research*, *101*(2), 159-164.
- Mayerhofer, J., Enkerli, J., Zelger, R., & Strasser, H. (2015). Biological control of the European cockchafer: persistence of *Beauveria brongniartii* after long-term applications in the Euroregion Tyrol. *BioControl*, *60*(5), 617-629.
- McGuire, K. L., Allison, S. D., Fierer, N., & Treseder, K. K. (2013). Ectomycorrhizal-dominated boreal and tropical forests have distinct fungal communities, but analogous spatial patterns across soil horizons. *PLoS One*, *8*(7), e68278.
- Meyling, N. V. (2007). *Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment*.

- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145-155.
- Meyling, N. V., & Hajek, A. E. (2010). Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *BioControl*, 55(1), 39-54.
- Meyling, N. V., Lubeck, M., Buckley, E. P., Eilenberg, J., & Rehner, S. A. (2009). Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, 18(6), 1282-1293.
- Meyling, N. V., & Pell, J. K. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31(2), 162-171.
- Meyling, N. V., Schmidt, N. M., & Eilenberg, J. (2012). Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. *Polar Biology*, 35(9), 1439-1445.
- Mfuti, D. K., Subramanian, S., Niassy, S., Salifu, D., du Plessis, H., Ekesi, S., & Maniania, N. K. (2016). Screening for attractants compatible with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for use in thrips management. *African Journal of Biotechnology*, 15(17), 714-721.
- Mfuti, D. K., Subramanian, S., van Tol, R. W., Wieggers, G. L., de Kogel, W. J., Niassy, S., du Plessis, H., Ekesi, S., & Maniania, N. K. (2015). Spatial separation of semiochemical Lurem-TR and entomopathogenic fungi to enhance their compatibility and infectivity in an autoinoculation system for thrips management. *Pest Management Science*.
- Arrêté du 5 juin 2009 relatif à l'utilisation de traitements dans le cadre de la lutte contre *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), *Rhagoletis completa* (Cresson), *Paysandisia archon* et les larves d'*Hoplochelus marginalis* et d'*Alissonotum piceum*, (2009).
- Mir, S., Dar, S., Mir, G., & Ahmad, S. (2014). Biology of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) on cucumber. *Florida Entomologist*, 97(2), 753-758.
- Mommaerts, V., & Smagghe, G. (2011). Entomovectoring in plant protection. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(2), 81-95.
- Moonjely, S., Barelli, L., & Bidochka, M. J. (2016). Insect pathogenic fungi as endophytes. *Advances in Genetics*, 94, 107-135.
- Mota, L. H. C., Silva, W. D., Sermarini, R. A., Demétrio, C. G. B., Bento, J. M. S., & Delalibera, I. (2017). Autoinoculation trap for management of *Hypothenemus hampei*

- (Ferrari) with *Beauveria bassiana* (Bals.) in coffee crops. *Biological Control*, 111, 32-39.
- Mouret, N., Martin, P., Roux, E., & Goebel, F.-R. (2017). Multi-scale Evaluation of the Impacts of *Beauveria* sp.(Ascomycota: Hypocreales) Used to Control the White Grub *Hoplochelus marginalis* (Fairmaire)(Coleoptera: Scarabaeidae) on Sugarcane in Réunion. *Sugar Tech*, 1-7.
- Nascimento, M., Sousa, A., Ramirez, M., Francisco, A. P., Carriço, J. A., & Vaz, C. (2016). PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*, 33(1), 128-129.
- Navarro-Llopis, V., Ayala, I., Sanchis, J., Primo, J., & Moya, P. (2015). Field efficacy of a *Metarhizium anisopliae*-based attractant–contaminant device to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 1570-1578.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., & Riba, G. (1997). 28s rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. *Molecular Ecology*, 6(4), 373-381.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B., & Riba, G. (1994). Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research*, 98(3), 322-328.
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Schoch, C. L., Nylander, J. A., Bergsten, J., & Porter, T. M. (2012). Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys*, 4, 37.
- Onstad, D., Fuxa, J., Humber, R., Oestergaard, J., Shapiro-Ilan, D., Gouli, V., Anderson, R., Andreadis, T., & Lacey, L. (2006). *An abridged glossary of terms used in invertebrate pathology* Society for Invertebrate Pathology Available from <http://www.sipweb.org/resources/glossary.html>
- Orgiazzi, A., Bianciotto, V., Bonfante, P., Daghino, S., Ghignone, S., Lazzari, A., Lumini, E., Mello, A., Napoli, C., & Perotto, S. (2013). 454 pyrosequencing analysis of fungal assemblages from geographically distant, disparate soils reveals spatial patterning and a core mycobiome. *Diversity*, 5, 73-98.
- Ormond, E. L., Thomas, A. P., Pugh, P. J., Pell, J. K., & Roy, H. E. (2010). A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(1), 146-154.
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374.

- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Alvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *105*(3), 270-278.
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(3), 267-270.
- Padín, S., Dal Bello, G., & Fabrizio, M. (2002). Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, *38*(1), 69-74.
- Padin, S., Dal Bello, G., & Vasicek, A. (1997). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae) in stored grains. *Entomophaga*, *42*(4), 569-574.
- Pal, S., Leger, R. J. S., & Wu, L. P. (2007). Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(12), 8969-8977.
- Pattemore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash, G. J. (2014). The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, *15*(1), 660.
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juarez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *146*(1-2), 124-137.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Fan, Y., Juarez, M. P., & Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(28), E3651-3660.
- Pedrini, N., Villaverde, M., Fuse, C., Dal Bello, G., & Juárez, M. (2010). *Beauveria bassiana* infection alters colony development and defensive secretions of the beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, *103*(4), 1094-1099.
- Pell, J., Hannam, J., & Steinkraus, D. (2010). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl*, *55*(1), 187-198.
- Pell, J. K., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Steinkraus, D. C. (2001). Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan

- (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 71-153). Wallingford, UK: CAB International.
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., & Baverstock, J. (2014). Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, *119*, 54-61.
- Porter, J. (1973). Agostino Bassi bicentennial (1773-1973). *Bacteriological Reviews*, *37*(3), 284.
- Posada, F., Aime, M. C., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Vega, F. E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, *111*(6), 748-757.
- Posada, F., & Vega, F. E. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, *97*(6), 1195-1200.
- Préfecture de La Réunion. (2013). *Arrêté n°1978 prescrivant les mesures de lutte obligatoire contre Hoplochelus marginalis et Alissonotum piceum à La Réunion*.
- Prendeville, H. R., & Stevens, L. (2002). Microbe inhibition by *Tribolium* flour beetles varies with beetle species, strain, sex, and microbe group. *Journal of Chemical Ecology*, *28*(6), 1183-1190.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959.
- QGIS Development Team. (2014). QGIS Geographic Information System (Version 2.14): Open Source Geospatial Foundation. Retrieved from <http://qgis.osgeo.org>
- Quandt, C. A., Kepler, R. M., Gams, W., Araújo, J. P., Ban, S., Evans, H. C., Hughes, D., Humber, R., Hywel-Jones, N., & Li, Z. (2014). Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA Fungus*, *5*(1), 121-134.
- Quesada-Moraga, E., Landa, B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R., & Santiago-Alvarez, C. (2006a). Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, *161*(5), 323-329.
- Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., & Santiago-Álvarez, C. (2008). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, *47*(1), 115-124.

- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Álvarez, C. (2006b). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 1955-1966.
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2003). Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology*, 13(3), 323-340.
- Ranque, S., Normand, A. C., Cassagne, C., Murat, J. B., Bourgeois, N., Dalle, F., Gari-Toussaint, M., Fourquet, P., Hendrickx, M., & Piarroux, R. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses*, 57(3), 135-140.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. P. (2003). Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes*, 3(3), 409-411.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. P. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., & Vega, F. E. (2006). Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 11-21.
- Renn, N., Bywater, A., & Barson, G. (1999). A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. *Journal of Applied Entomology*, 123(5), 309-314.
- Rice, W. C., & Cogburn, R. R. (1999). Activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against three coleopteran pests of stored grain. *Journal of Economic Entomology*, 92(3), 691-694.
- Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Pastou, D., Payet-Hoareau, M., Goble, T. A., Linderme, D., Lefeuvre, P., Calmes, C., Reynaud, B., Nibouche, S., & Costet, L. (2015). Description and phylogenetic placement of *Beauveria hoplocheli* sp. nov. used in the biological

- control of the sugarcane white grub, *Hoplochelus marginalis*, in Reunion Island. *Mycologia*, 107(6), 1221-1232.
- Roberts, D. W., & Humber, R. A. (1981). Entomogenous fungi. *Biology of conidial fungi*, 2, 201-236.
- Robinson, R. (1966). Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Articles & News Summaries. Section B. Plant Disease Control*, 12(2-3), 131-142.
- Roche, A., Cox, N., Richardson, L., Buhr, R., Cason, J., Fairchild, B., & Hinkle, N. (2009). Transmission of *Salmonella* to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poultry Science*, 88(1), 44-48.
- Roderick, G. K., & Navajas, M. (2003). Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nature Reviews Genetics*, 4, 889.
- Roessler, Y. (1989). Insecticidal bait and cover sprays *World Crop Pests* (Vol. 3, pp. 329-337).
- San Andrés, V., Ayala, I., Abad, M. C., Primo, J., Castañera, P., & Moya, P. (2014). Laboratory evaluation of the compatibility of a new attractant contaminant device containing *Metarhizium anisopliae* with *Ceratitis capitata* sterile males. *Biological Control*, 72, 54-61.
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101-107.
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288-293.
- Scheepmaker, J. W. A., & Butt, T. M. (2010). Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5), 503-552.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding, C., & Fungal Barcoding Consortium Author, L. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246.

- Schwarzenbach, K., Enkerli, J., & Widmer, F. (2009). Effects of biological and chemical insect control agents on fungal community structures in soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 54-62.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 413-423.
- Shapiro-Ilan, D. I., Fuxa, J. R., Lacey, L. A., Onstad, D. W., & Kaya, H. K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(1), 1-7.
- Sharma, S., Gupta, R. B. L., & Yadava, C. P. S. (1999). Effect of certain soil fungi on *Metarhizium* and *Beauveria* spp. and their pathogenicity against *Holotrichia consanguinea*. *Indian Phytopathology*, 52(2), 196-197.
- Shimazu, M., Mitsuhashi, W., & Hashimoto, H. (1988). *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 29, 323-330.
- Shipp, L., Kapongo, J. P., Park, H.-H., & Kevan, P. (2012). Effect of bee-vectored *Beauveria bassiana* on greenhouse beneficials under greenhouse cage conditions. *Biological Control*, 63(2), 135-142.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794-1805.
- Shrestha, B., Hyun, M. W., Oh, J., Han, J.-G., Lee, T. H., Cho, J. Y., Kang, H., Kim, S. H., & Sung, G.-H. (2014). Molecular evidence of a teleomorph-anamorph connection between *Cordyceps scarabaeicola* and *Beauveria sungii* and its implication for the systematics of *Cordyceps* sensu stricto. *Mycoscience*, 55(3), 231-239.
- Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., & Liu, X. (2010). What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology*, 1(4), 228-236.
- Smith, R. J., & Grula, E. A. (1981). Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(3), 222-230.
- Sookar, P., Bhagwant, S., & Allymamod, M. N. (2014). Effect of *Metarhizium anisopliae* on the fertility and fecundity of two species of fruit flies and horizontal transmission of mycotic infection. *Journal of Insect Science*, 14(100), 1-12.
- Sosa-Gomez, D., & Moscardi, F. (1994). Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. *Florida Entomologist*, 77(2), 284-287.

- Spatafora, J., Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N., & White, J. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology*, *16*(8), 1701-1711.
- SPL Energies Réunion. (2017). Bilan énergétique - Ile de La Réunion 2016.
- St. Leger, R. J. (1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. *Parasites and pathogens of insects*, *2*, 211-229.
- St. Leger, R. J., Butt, T. M., Goettel, M. S., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1989). Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, *13*(3), 274-288.
- St. Leger, R. J., Charnley, A. K., & Cooper, R. M. (1987). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *253*(1), 221-232.
- St. Leger, R. J., Durrands, P. K., Charnley, A. K., & Cooper, R. M. (1988). Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *52*(2), 285-293.
- St. Leger, R. J., May, B., Allee, L. L., Frank, D. C., Staples, R. C., & Roberts, D. W. (1992). Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *60*(1), 89-101.
- St. Leger, R. J., Wang, C., & Fang, W. (2011). New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Reviews*, *25*(2), 84-88.
- Strasser, H., Abendstein, D., Stuppner, H., & Butt, T. M. (2000). Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycological Research*, *104*(10), 1227-1233.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J. J., Shrestha, B., & Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, *57*, 5-59.
- Sung, G.-H., Poinar Jr, G. O., & Spatafora, J. W. (2008). The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*(2), 495-502.
- Sung, J.-M., Lee, J.-O., Humber, R. A., Sung, G.-H., & Shrestha, B. (2006). *Cordyceps bassiana* and Production of Stromata in vitro Showing *Beauveria* Anamorph in Korea. *Mycobiology*, *34*(1), 1-6.

- Suzuki, Y., & Koyama, J. (1981). Courtship behavior of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology*, 16(2), 164-166.
- Svedese, V. M., Lima, E. Á. d. L. A., & Porto, A. L. F. (2013). Horizontal transmission and effect of the temperature in pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 413-419.
- Swanson, J. A. I., Torto, B., Kells, S. A., Mesce, K. A., Tumlinson, J. H., & Spivak, M. (2009). Odorants that Induce Hygienic Behavior in Honeybees: Identification of Volatile Compounds in Chalkbrood-Infected Honeybee Larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 35(9), 1108-1116.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050.
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., & Mozaffari, J. (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5), 525-534.
- Thaochan, N., & Ngampongsai, A. (2015). Effects of autodisseminated *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 629-644.
- Thomas, K., Khachatourians, G., & Ingledew, W. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(1), 12-20.
- Thomsen, L., & Jensen, A. B. (2002). Application of nested-PCR technique to resting spores from the *Entomophthora muscae* species complex: implications for analyses of host-pathogen population interactions. *Mycologia*, 94(5), 794-802.
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18.
- Todorova, S., Côté, J.-C., Martel, P., & Coderre, D. (1994). Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bio-assays of *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) and *Coleomegilla maculata lengi* (Col.: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga*, 39(2), 159-169.

- Toledo, A. V., Alippi, A. M., & de Remes Lenicov, A. M. M. (2011). Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. *Journal of Insect Science*, *11*(29).
- Toledo, J., Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., Enkerlin, W., Liedo, P., Valle, Á., & Montoya, P. (2017). Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.
- Uma Devi, K., Padmavathi, J., Uma Maheswara Rao, C., Khan, A. A. P., & Mohan, M. C. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, *18*(10), 975-989.
- Urbina, H., Scofield, D. G., Cafaro, M., & Rosling, A. (2015). DNA-metabarcoding uncovers the diversity of soil-inhabiting fungi in the tropical island of Puerto Rico. *bioRxiv*, 025668.
- Urtz, B., & Rice, W. (1997). RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. *Letters in Applied Microbiology*, *25*(6), 405-409.
- Valero-Jiménez, C. A., Debets, A. J., van Kan, J. A., Schoustra, S. E., Takken, W., Zwaan, B. J., & Koenraadt, C. J. (2014). Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal*, *13*(1), 1-8.
- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M., & van Kan, J. A. L. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *133*, 41-49.
- Van Lenteren, J. C., Bale, J., Bigler, F., Hokkanen, H. M. T., & Loomans, A. J. M. (2006). Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology*, *51*, 609-634.
- Vega, F. E., Dowd, P. F., Lacey, L. A., Pell, J. K., Jackson, D. M., & Klein, M. G. (2007). Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In L. A. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), *Field manual of techniques in invertebrate pathology* (pp. 127-146): Springer Netherlands.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., & Roy,

- H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159.
- Vega, F. E., Posada, F., Catherine Aime, M., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46(1), 72-82.
- Vercambre, B., Charbonnier, G., Launois, M., & Laveissière, G. (2008). *Le ver blanc au paradis vert: ou l'histoire vécue d'un bio-envahisseur de la canne à sucre en milieu insulaire*: CIRAD.
- Vercambre, B., Goebel, O., Neuvéglise, C., Desgranges, C., Robert, P., & Riba, G. (1993, 7-9 December 1993). *Lutte biologique contre Hoplochelus marginalis (Coleopt., Melolonthinae) à l'aide de Beauveria brongniartii (Deuteromycotina, Hyphomycete)*. Paper presented at the International Conference on pests in agriculture, Montpellier.
- Vercambre, B., Goebel, O., Riba, G., Marchal, M., Neuvéglise, C., & Ferron, P. (1994). *Success in biological control of a soil pest, Hoplochelus marginalis, in Reunion island: choice of a suitable fungus*. Paper presented at the VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, France.
- Vercambre, B., Goebel, O., Riba, G., Morel, G., Robert, P., & Guillon, M. (1990, 1990 Nov 5-7). *Programme de lutte biologique contre Hoplochelus marginalis (Coleoptera: Melolonthinae), nouveau ravageur des cultures à l'île de la Réunion*. Paper presented at the Rencontres Caraïbes en Lutte Biologique, Guadeloupe.
- Vercambre, B., Robert, P., & Marchal, M. (1988). *Le ver blanc (Hoplochelus marginalis Fairmaire, Coleoptera, Melolonthinae). Quel avenir ? Quelle stratégie ?* Paper presented at the 3e Congrès ARTAS, La Réunion.
- Vestergaard, S., Cherry, A., Keller, S., & Goettel, M. (2003). Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In H. M. T. Hokkanen & A. E. Hajek (Eds.), *Environmental impacts of microbial insecticides: need and methods for risk assessment* (pp. 35-62). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Viaud, M., Pasquier, A., & Brygoo, Y. (2000). Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*, 104(09), 1027-1032.
- Vuillemin, P. M. (1912). *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 59(1), 34-40.
- Wagner, B. L., & Lewis, L. C. (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3468-3473.

- Wang, C., & Leger, R. J. S. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6647-6652.
- Wang, C., Shah, F. A., Patel, N., Li, Z., & Butt, T. M. (2003). Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 5(10), 908-915.
- Wang, C., & St Leger, R. J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5), 808-816.
- Wang, C., & St. Leger, R. J. (2005). Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 937-947.
- Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. *Molecules*, 17(3), 2367.
- White, I. M., & Elson-Harris, M. M. (1992). *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*: CAB International.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics — identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974.
- Wraight, S. P., & Ramos, M. E. (2015). Delayed efficacy of *Beauveria bassiana* foliar spray applications against Colorado potato beetle: Impacts of number and timing of applications on larval and next-generation adult populations. *Biological Control*, 83, 51-67.
- Wraight, S. P., Ramos, M. E., Avery, P. B., Jaronski, S. T., & Vandenberg, J. D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3), 186-199.
- Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., Shang, Y., Leger, R. J. S., Zhao, G.-P., Wang, C., & Feng, M.-G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483.
- Zare, M., Talaei-Hassanloui, R., & Fotouhifar, K.-B. (2014). Relatedness of proteolytic potency and virulence in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of Crop Protection*, 3(4), 425-434.

- Zhang, S.-l., He, L.-m., Chen, X., & Huang, B. (2012). *Beauveria lii* sp. nov. isolated from *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Mycotaxon*, 121(1), 199-206.
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., & Keyhani, N. O. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology*, 80(3), 811-826.
- Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., Zheng, H., Huang, Y., Zhou, Y., & Wang, S. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*, 12(11), 1-22.
- Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., & Forschler, B. T. (2013). Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects*, 4(4), 609-630.
- Zimmermann, G. (1986). The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Clara ROHRLICH en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 05/09/2018

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.