

# CARACTERIZACIÓN DE CUATRO AISLADOS CUBANOS DE *BEAUVERIA* SPP. CON PERSPECTIVAS PARA EL CONTROL DE PLAGAS AGRÍCOLAS

## CHARACTERIZATION OF FOUR CUBAN ISOLATES OF *BEAUVERIA* SPP. PROMISING FOR AGRICULTURAL PEST CONTROL

Yamilé Baró Robaina<sup>1</sup>, José Michael Hernández Vargas<sup>2</sup>, Yohana Gato Cárdenas, Yaremis Ulloa Martín<sup>1</sup> y Ángela Porras<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ta. B y 5ta. F, Playa, La Habana

<sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 e/ J e I, Plaza de la Revolución, La Habana, ybaro@inisav.cu; <https://orcid.org/0000-0001-5656-4110>

### RESUMEN

Los hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Beauveria* se consideran agentes de biocontrol por su alta efectividad contra plagas agrícolas. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar cuatro aislados cubanos de *Beauveria* spp. pertenecientes a la colección de microorganismos del Inisav para su selección como agentes de control de plagas agrícolas. Los aislados LBb-1234, LBb-Cp2, LBb-76 y LBb-IIIIF se caracterizaron en cuanto a la morfología de los conidios y características culturales de las colonias. Se evaluó la influencia de diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación en el crecimiento y esporulación, así como la producción de enzimas extracelulares de manera cualitativa. Se determinó la patogenicidad sobre adultos de *Cylas formicarius*. El aislado LBb-1234 se seleccionó para la reproducción sobre el sustrato cabecilla de arroz por tecnología bifásica. Los resultados indicaron que diferentes medios de cultivos y temperaturas de incubación influyen en el crecimiento y esporulación de los aislados, siendo el aislado LBb-1234 el de mayor esporulación y patogenicidad hacia *C. formicarius*. El bioproducto obtenido cumplió los parámetros de calidad que se establecen como requisitos en la Norma Cubana para este tipo de tecnología.

Palabras claves: Taxonomía, *Hypocreales*, *Cylas formicarius*, patogenicidad, bioplaguicidas.

### ABSTRACT

The entomopathogenic fungi of the *Beauveria* genus are considered biological control agents for their high effectiveness against agricultural pests and their minimal impact on beneficial insects, the environment and humans. The objective of this research was to evaluate four Cuban isolates of *Beauveria* spp. belong to the Microbial Culture Collection of the INISAV, promising for agricultural pests control. The isolates LBb-1234, LBb-Cp2, LBb-76 and LBb-IIIIF were characterized in terms of morphology of the conidia and cultural characteristics of the colonies. The influence on growth of different culture media and incubation temperatures and sporulation were determinate. The production of extracellular enzymes was qualitatively evaluated, as well as the pathogenicity against adults of *Cylas formicarius*. In addition, LBb-1234 isolate was selected for growth by two-stage production, on rice as substrate. The results indicated that the culture media and different temperatures influence in the growth and sporulation of the isolates, being LBb-1234 the one with the highest level of sporulation and high pathogenicity towards *C. formicarius*. The bioproduct based on LBb-1234 reached the quality parameters established as requirements in the Cuban Standard for this type of technology.

Key words: Taxonomy, *Hypocreales*, *Cylas formicarius*, pathogenicity, biopesticides.

### INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son ubicuos en la naturaleza, son capaces de crear epizootias en los insectos hospederos y poseen características que favorecen su desarrollo como agentes microbiológicos de control. Tradicionalmente estos hongos han sido considerados patógenos exclusivos de artrópodos plagas; sin embargo, diversos estudios han demostrado que ellos ocupan

una gran diversidad de nichos ecológicos (Rehner *et al.*, 2011).

*Beauveria* (*Hypocreales: Cordycipitaceae*) es uno de los hongos entomopatógenos más utilizados comercialmente para el control biológico de plagas agrícolas a nivel mundial. Su amplio espectro de acción abarca alrededor de 750 especies de insectos, de los órdenes

ortóptera, lepidóptera, coleóptera y díptera. Se considera un agente de control biológico ambientalmente seguro por su escasa especificidad hacia insectos no blanco, por lo que diferentes compañías productoras de bioplaguicidas desarrollan formulaciones micoinsecticidas a base de cepas de este microorganismo (Lancey *et al.*, 2015; Imoulan *et al.*, 2017; Khonsanit *et al.*, 2020).

Este género se distingue morfológicamente por la presencia de conidióforos que se levantan a partir de las hifas vegetativas de 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho, sosteniendo grupos de células conidiógenas, globosas a forma de botella, con un raquis bien desarrollado, donde predominan los conidios hialinos, elipsoidales y apiculados, algunos subglobosos. Aunque estas características distinguen al género, la identificación de las especies es difícil a partir de las características fenotípicas, por lo que el uso de métodos moleculares es un requisito necesario para la identificación de los aislados. El enfoque más apropiado para discriminar especies estrechamente relacionadas utiliza el análisis de múltiples *locus* [Multi locus sequence analysis, por sus siglas en inglés (MLSA)]. Hasta la fecha se han identificado un total de 17 especies de *Beauveria* mediante el análisis de las secuencias parciales de los *locus* nucleares: primera subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB1), la segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB2), el factor de la elongación y la traducción (TEF1) y la región nuclear intergénica Bloc, los que se han seleccionado como marcadores filogenéticos para evaluar confiablemente el límite de especies crípticas dentro del complejo *B. bassiana sensu lato* y la identificación de nuevas especies (Imoulan *et al.*, 2017).

En Cuba desde 1988 se reproduce de forma masiva la cepa LBB-1 en los Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE). Su uso ha sido de gran impacto para el control del tetuán del boniato (*Cylas formicarius elegantulus*), contra el picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*) y contra el picudo verde azul (*Pachnaeus litus*) y para el control de la bi-

bijagua (*Atta insularis*). Sin embargo, ha existido poco avance en la selección e introducción de nuevas cepas con potencial de control para satisfacer la demanda actual de bioplaguicidas y la posibilidad de reducir la aplicación de insecticidas químicos.

Una de las principales desventajas del uso de los hongos entomopatógenos en el control biológico es la susceptibilidad de estos microorganismos a diferentes factores ambientales, como la temperatura y la radiación solar. También la pérdida de virulencia debido a los pasajes sucesivos de la cepa o largos períodos de uso si no se realiza un manejo adecuado. Por tal motivo, las investigaciones actuales se enfocan a la selección, evaluación de nuevos aislados autóctonos y el desarrollo de formulaciones más estables, que garanticen una mayor viabilidad de las estructuras infectivas y estabilidad del producto en condiciones de almacenamiento.

La colección de microorganismos entomopatógenos y antagonistas del Inisav dispone de aislados de *Beauveria* spp. obtenidos de diferentes hospedantes y regiones geográficas de Cuba que no han sido caracterizados, los que pueden formar parte de las estrategias de control biológico de plagas de interés económico. Por tal motivo este trabajo tuvo como objetivos caracterizar aislados cubanos de *Beauveria* spp. considerando el crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, la producción de enzimas extracelulares y la actividad patogénica contra *C. formicarius*. Se evaluó el crecimiento sobre el sustrato cabecilla de arroz mediante método bifásico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico:** Se utilizaron cuatro aislados fúngicos de *Beauveria* spp. pertenecientes a la colección de microorganismos entomopatógenos del Inisav (Tabla 1). Los aislados se conservaron en medio de cultivo agar dextrosa de saboraud (SDA) a 4 °C hasta la realización de los ensayos.

**Tabla 1. Origen de los aislados de *Beauveria* spp. empleados en la investigación**

**Table 1. Origin of *Beauveria* spp. isolates used in the research**

Denominación de los aislados	Origen geográfico	Fuente de aislamiento
LBb-76	Pinar del Río	Aislado de suelo trampeado con <i>Galleria melonella</i> (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)
LBb-Cp2	Santiago de Cuba	<i>Hypothenemus hampei</i> Ferrari (Coleoptera: Curculionidae)
LBb-1234	Santiago de Cuba	<i>H. hampei</i>
LBb-III f	Santiago de Cuba	<i>H. hampei</i>

**Especies de insectos:** Adultos de *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae) obtenidos de la cría en el laboratorio del Inisav mantenidos con tubérculos sanos de *Ipomea batata* L. (boniato) a temperatura ambiente hasta la realización de los ensayos.

### Caracterización cultural y morfológica

Para cada aislado se preparó una suspensión de conidios de la que se tomó 0,1 mL y se sembró con espátula de Drygalski en medio agar papa dextrosa (PDA). Las placas se incubaron a  $25 \pm 2$  °C. Transcurrido 72 h se transfirieron discos de 5 mm de diámetro al centro de placas de Petri con PDA, las que se incubaron bajo las mismas condiciones. A partir de las 72 h de incubación se revisó diariamente el crecimiento de los aislados hasta los 10 días y se anotaron las características culturales teniendo en cuenta el diámetro de la colonia, color, borde, textura y pigmentación del medio de cultivo. Se describió la morfología de los conidios y se midió la talla (largo x ancho) en microscopio de contraste de fase Carl Zeiss (40x y 100x). Se midieron 50 conidios por aislado y se consideraron los valores extremos y mínimos según los criterios taxonómicos citados por Rehner *et al.*, 2005, 2011).

### Evaluación del crecimiento de los aislados de *Beauveria* spp. en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación

Los aislados se sembraron en placas con medio de cultivo PDA y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C. Transcurridas 72 h se tomaron discos de 5 mm con un sacabocado y se transfirieron al centro de placas Petri de 9 cm de diámetro con los siguientes medios de cultivo:

- Medio completo<sup>1</sup> (MC)
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Agar dextrosa de Saboraud (SDA)
- Extracto de malta (MEA)
- Agar Czapek- Dox (CDA)

<sup>1</sup>0,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,6 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 1,0 g de KCl; 0,7 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 10 g de glucosa, 15 g de agar-agar; 5 g de extracto de levadura; 1000 mL de agua destilada.

Se midió diariamente el diámetro de las colonias hasta los 10 días. Se realizaron cinco réplicas por aislado (Onofre *et al.*, 2001).

Para evaluar el crecimiento a diferentes temperaturas se utilizó el procedimiento descrito anteriormente y se incubó a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34 °C.

Se calculó el nivel de esporulación a partir del último día del crecimiento de la colonia. Se tomó un disco con un sacabocado de la zona más próxima al centro de la colonia. El disco se llevó a un tubo de ensayo con 5 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,1 % v/v y se agitó por 10 min. Se contó el número de conidios en cámara de Neubauer a 400x en microscopio de contraste de fase. Se halló el valor promedio y se calculó el número de conidios  $\cdot \text{mm}^{-2}$  (Pacolla-Meirelles y Azevedo, 1990).

### Evaluación cualitativa de la producción de enzimas extracelulares

La detección de enzimas extracelulares proteasa, amilasa, lipasa, quitinasa y caseinasa se realizó según protocolo propuesto por Sanivada y Challa, 2014. La actividad enzimática se expresó como la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo causado por la degradación del sustrato. La presencia de la actividad enzimática se constató a partir de valores de índice enzimático mayores a 1 (St. Leger *et al.*, 1997).

Para cada enzima evaluada las placas de Petri con el medio de crecimiento específico se inocularon con discos de 5 mm de diámetro con micelio de los aislados, los que se incubaron a  $25 \pm 2$  °C durante 10 días. Se utilizó como control negativo el crecimiento de los aislados en medio mínimo de crecimiento (0,003 % NaCl, 0,03 %  $\text{MgSO}_4$ , y 0,015 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) con el 2 % de agar, sin el sustrato de la enzima a ensayar.

### Determinación de la patogenicidad de los aislados de *Beauveria* spp. sobre *Cylas formicarius*

Se prepararon frascos Roux de 100 mL de capacidad con medio de crecimiento SDA, los que se inocularon con una suspensión de los aislados a ensayar. Los mismos se incubaron a  $25 \pm 2$  °C hasta alcanzar la completa esporulación del cultivo aproximadamente 10 días. Transcurrido ese tiempo se realizó una suspensión de cada aislado a una concentración de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conidios  $\cdot \text{mL}^{-1}$  ajustada por conteo en cámara de Neubauer.

Para cada dilución se utilizaron 50 adultos de *C. formicarius*, los que fueron previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,1 % durante 1 min. Posteriormente se enjuagaron en agua destilada estéril y se sumergieron de 30 a 60 s en las suspensiones fúngicas preparadas anteriormente. Se utilizó un tratamiento control con agua destilada estéril. Los insectos tratados se colocaron en una placa que contenía papel

de filtro para absorber el exceso de humedad y se introdujeron en placas de Petri estériles con dieta natural a base de boniato. Las placas con los insectos se incubaron a temperatura ambiente.

Diariamente se cuantificaron los insectos vivos y muertos para calcular el porcentaje de mortalidad según la fórmula de Abbot. Los tiempos letales (TL)  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  se calcularon a partir de las ecuaciones de regresión Probit que expresan la relación entre el porcentaje de mortalidad y el tiempo. Se utilizó el paquete estadístico Statistica Version 8.0.

Al finalizar el bioensayo los insectos muertos se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C de temperatura para confirmar si la muerte de los insectos fue provocada por los aislados de *Beauveria* spp.

### Reproducción a escala piloto del aislado LBb-1234 por método bifásico

Se evaluó la reproducción del aislado LBb-1234 sobre sustrato sólido según el procedimiento descrito por Márquez *et al.*, 2010.

Para la obtención del inóculo se preparó medio líquido compuesto de levadura torula  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y azúcar  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Se esterilizó 20 min a 121 °C. Cada erlenmeyer se inoculó con 1 mL de la suspensión del aislado. Los erlenmeyers se colocaron en zaranda por 48-50 h a 180 r.p.m. y temperatura entre 25-27 °C. Transcurrido ese tiempo se ajustó la concentración de los inóculos a  $5 \times 10^7$  blastosporas  $\cdot \text{mL}^{-1}$  para inocular 20 mL en el sustrato sólido.

La reproducción sobre sustrato sólido se realizó en potes plásticos que contenían 150 g del sustrato cabecilla de arroz. Se emplearon 20 potes plásticos y un contenedor control sin inóculo del hongo. La producción se realizó en un cuarto de incubación con humedad

ambiental menor al 80 %. Los potes inoculados se incubaron a 25-27 °C.

Para el control de calidad de la muestra final se determinó la concentración, pureza y la viabilidad, según protocolos descritos en la Norma Cubana NC 1016: 2014.

### Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se procesaron mediante Análisis de Varianza de clasificación simple (ANOVA) con test de significación de Tukey al 5 %. En caso de no cumplirse los supuestos del ANOVA se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y test de comparación Mann Whitney 2 a 2. Se utilizó el programa SPSS 15.0 para Windows, versión 15.0.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización cultural y morfológica

En la caracterización morfológica y cultural de los aislados estudiados se evidenció que después de 10 días de incubación, los mismos comparten características morfológicas similares. En todos se observó colonias de color blanco algodonosas que se tornan pulverulentas con el desarrollo de los conidios; algunas difunden pigmento de color amarillo pálido a amarillo intenso en el medio de crecimiento. Los valores medios del diámetro de las colonias estuvo entre 2,0-3,5 cm (*Tabla 2, Fig. 1*). Los aislados estudiados presentaron conidios de morfología globosa a subglobosas.

De manera general, las características culturales y morfológicas permiten indicar que los aislados pertenecen a *Beauveria bassiana*, pero no posibilitan la identificación precisa de los mismos, y aunque estos caracteres han sido importantes para identificar la especie es imprescindible el empleo de otros métodos como los moleculares.

**Tabla 2.** Características culturales y morfológicas de los aislados de *Beauveria* spp. estudiados

**Table 2.** Cultural and morphological characteristics of *Beauveria* spp. isolates

<i>Aislados</i>	<i>Morfometría de los conidios</i>	<i>Características culturales de las colonias</i>
LBb-IIIIf	Conidios globosos, subglobosos apiculados de 2,0-2,03 x 1,0-1,9 $\mu\text{m}$	Colonia de 3,3 cm de diámetro con aspecto aterciopelado, pegado al medio de cultivo de crecimiento, esporulación difusa de color blanco con pequeñas pústulas en forma radial desde el centro de la colonia. Bordes regulares, reverso incoloro. No difunde pigmento al medio de cultivo
LBb-76	Conidios globosos a subglobosos apiculados de 1,0-1,76 x 1,0-1,72 $\mu\text{m}$	Colonia de 2,3 cm de diámetro, al inicio blanco algodonosas (hasta cinco días) compactas que con el tiempo se tornan crema y aspecto polvoriento, bordes regulares y al reverso amarillo pálido

LBb-Cp2	Conidios globosos a subglobosos apiculados de 1,0-2,3 x 1,0-2,2 $\mu\text{m}$	Colonia de 2,1 cm de diámetro, al inicio blanco algodonosa que se tornan de color crema y polvoriento con la esporulación. Bordes irregulares. Reverso amarillo pálido
LBb-1234	Conidios globosos a subglobosos algunos apiculados de 1,0-1,65 x 1,0-1,9 $\mu\text{m}$	Colonia de 2,0 cm de diámetro, al inicio blanco algodonosas (hasta cinco días) compactas, que con el tiempo se tornan crema y de aspecto polvoriento, bordes regulares y al reverso amarillo pálido

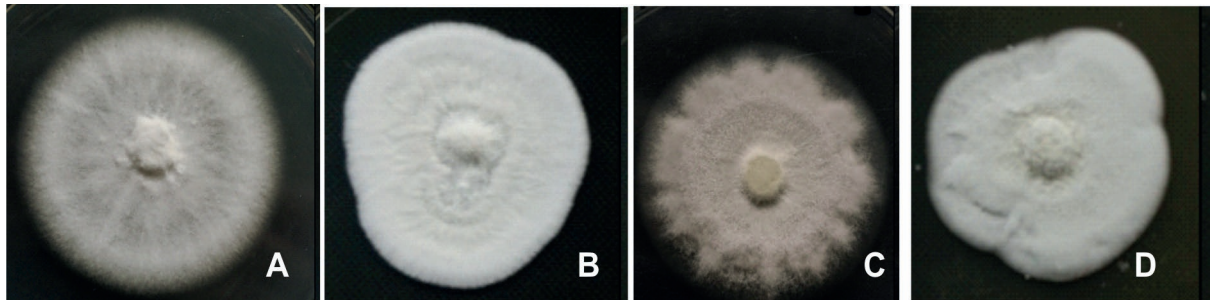


Figura 1. Características de la morfología de las colonias de los aislados de *Beauveria* spp. en medio de crecimiento PDA. A: LBb-IIIIf; B: LBb-76; C: LBb-Cp2; D: LBb-1234. (Fotos tomadas con cámara Sony DSC-S2000).  
 Figure 1. Morphologic characteristics of *Beauveria* spp. colonies grown on PDA. A: LBb-IIIIf; B: LBb-76; C: LBb-Cp2; D: LBb-1234. (Photos taken with digital camera Sony DSC-S2000)

Resultados similares obtuvo Elosegú *et al.* (2006). Estos autores describieron las características más notables de aislados de *Beauveria* obtenidos de insectos micosados. El tamaño de los conidios estuvo en un rango de 1,0-2,5  $\mu\text{m}$ , la morfología de globosos a subglobosos y algunos elipsoidales.

Por su parte, Rehner y Buckley (2005) informan la forma de los conidios de 90 aislados de *Beauveria* estudiados, entre globosos, elipsoidales, cilíndricos y con forma de coma y el tamaño entre 1,6-7,1  $\mu\text{m}$ . Estos autores lograron establecer grupos a partir del análisis morfológico de los aislados con características similares, en los que posteriormente se observó diversidad filogenética a partir del análisis molecular.

Diversos autores informan que *Beauveria* presenta pocos caracteres morfológicos que permiten su diferenciación a nivel taxonómico. Las características del crecimiento y la apariencia de las colonias son similares entre la mayoría de las especies del género, lo cual coincide con los resultados en este trabajo (Rehner *et al.*, 2011; Sentil Kumar, 2016).

Respecto a las colonias, generalmente se observan blancas a ligeramente amarillas, con una textura lanosa o algodonosa que frecuentemente se vuelve

harinosa con la acumulación de los conidios en la superficie de los cultivos. Se exceptúa *B. malawiensis* con colonias que son ligeras o intensamente rosadas, y *B. sungii*, que son amarillo intensas. La única especie caracterizada sobre la base de la morfología de los conidios es *B. vermiconia*, la cual produce conidios cortos en forma de coma u hoz. Por otra parte, la forma de los conidios en otras especies de *Beauveria* son más o menos globosos a subglobosos, elipsoidales, oblongos o cilíndricos. Las especies dentro de cada una de estas categorías se solapan en el tamaño y son difíciles de diferenciar (Rehner *et al.*, 2011; Imoulan *et al.*, 2017).

Estudios realizados décadas atrás han basado la caracterización de este hongo por la descripción y medidas de estructuras de interés taxonómico (Rehner y Buckley, 2005; Rehner *et al.*, 2011), sus características fisiológicas (Liu *et al.*, 2003) y patogénicas (Wright *et al.*, 2008) y los resultados de estudios isoenzimáticos (Fernandes *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha visto que son insuficientes para investigar especies como *B. bassiana* (Rehner y Buckley, 2005; Rehner *et al.*, 2011). Por tal motivo, en la actualidad para la taxonomía de las especies del género se emplea el análisis de las secuencias parciales de la región nuclear intergénica Bloc, y de tres genes que codifican proteínas nucleares

como TEF1, RPB1 y RPB2 (Imoulan *et al.*, 2016; Khonasabit *et al.*, 2020).

En general, una de las principales desventajas de la caracterización morfológica es que las características a medir son limitadas en número, por lo cual la discriminación entre aislamientos es difícil. Sin embargo, algunas de estas características como la virulencia o el nivel de esporulación son variables críticas que medir en los sistemas de producción y de su estabilidad depende en gran parte el éxito del producto (Jenkins y Grzywacz, 2003). De ahí el

que tan alto número de estudios se enfoquen en determinar la estabilidad fenotípica con respecto a estas variables en los aislados potencialmente útiles para desarrollarse como bioplaguicidas.

### Evaluación del crecimiento de los aislados de *Beauveria* spp. en diferentes medios de cultivo

La *Tabla 3* muestra el crecimiento de los aislados de *Beauveria* en los diferentes medios de cultivo ensayados. Los medios más favorables para el crecimiento fueron MEA, MC y SDA.

**Tabla 3. Diámetros promedios del crecimiento de las colonias de los aislados de *Beauveria* spp. en diferentes medios de cultivo a los 10 días de incubación**

**Table 3. Colony diameters of *Beauveria* isolates in different culture media at 10 days post-inoculation**

<i>Aislados</i>	<i>Medios de cultivo (Media ± ES)</i>				
	<i>SDA</i>	<i>PDA</i>	<i>MEA</i>	<i>CDA</i>	<i>MC</i>
LBb-1234	2,99 ± 0,05c	2,01 ± 0,06d	3,59 ± 0,05 a	1,57 ± 0,05e	3,28 ± 0,05b
LBb-76	2,68 ± 0,14c	3,37 ± 0,13b	4,28 ± 0,13a	3,23 ± 0,13bc	4,67 ± 0,13a
LBb-IIIF	3,54 ± 0,02b	3,27 ± 0,02c	3,42 ± 0,03b	3,13 ± 0,02c	3,93 ± 0,02a
LBb-Cp2	2,57 ± 0,11c	3,10 ± 0,11b	3,62 ± 0,11a	2,47 ± 0,11c	2,84 ± 0,11bc

Las letras comunes en las filas indican que no hay diferencias significativas. Test de significación de Tukey  $p \leq 0,05$ . Same letters in files means not significant differences in these variants. Tukey test  $p \leq 0,05$ .

En el aislado LBb-1234 se encontraron diferencias significativas en el diámetro de crecimiento de las colonias en todos los medios de cultivo, siendo MEA donde se obtuvo el mayor valor de crecimiento de la colonia, y en agar Czapek el menor valor; comportamiento similar se obtuvo en el aislado LBb-Cp2. En este aislado no se encontró diferencias entre agar Czapek y SDA, como tampoco entre MC y PDA.

El aislado LBb-IIIf tuvo su mayor valor de crecimiento en MC, difiriendo significativamente del resto de los medios de cultivos. Este aislado, al igual que LBb-1234, obtuvo el menor crecimiento en el medio de cultivo CDA.

El aislado LBb-76 no mostró diferencias significativas de crecimiento en los medios MEA y MC. En este último alcanzó su mayor crecimiento. Sin embargo, su menor diámetro fue en SDA sin grandes diferencias con CDA, en el que obtuvo un comportamiento similar con PDA.

La *Fig. 2* muestra la morfología de las colonias de los aislados de *Beauveria* en los medios de crecimiento.

Nótese la difusión de pigmento amarillo intenso del aislado LBb-Cp2 en el medio Czapek (2B).

La composición y concentración de nutrientes presentes en cada medio de cultivo: fuentes de carbono, nitrógeno, sales minerales y la relación carbono/nitrógeno intervienen notablemente en la germinación, crecimiento de las hifas y en la emergencia del tubo germinativo.

Estas características influyen para que un mismo aislado presente características culturales diferentes (Chan-Cupul *et al.*, 2010; Obando *et al.*, 2013). Onofre *et al.* (2001) plantearon que existen factores promotores del crecimiento, los cuales están presentes en los diferentes medios de cultivo empleados. Estos factores pueden ser los responsables del mejor comportamiento y crecimiento de las colonias en medios con un alto contenido de nutrientes.

Con relación a la concentración de conidios, se observó diferencias significativas en los medios de cultivo evaluados (*Tabla 4*).

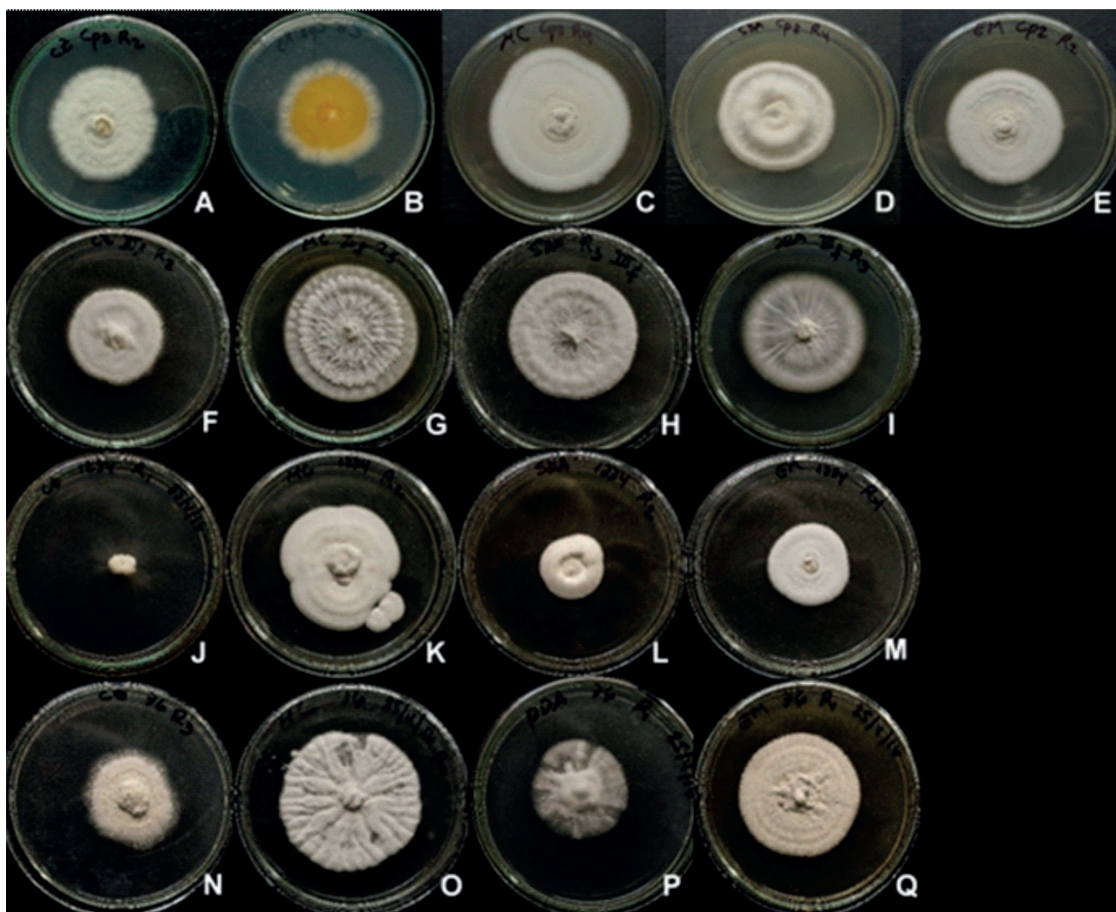


Figura 2. Morfología de las colonias de los aislados de *Beauveria* en diferentes medios de cultivo a los 10 días de crecimiento. LBb-Cp2: A-CDA, B-CDA reverso, C-MC, D-SDA, E-MEA; LBb-IIIif: F-CDA, G-MC, H-SDA, I-MEA; LBb-1234: J-CDA, K-MC, L-SDA, M-MEA; LBb-76: N-CDA, O-MC, P-SDA, Q-MEA.  
 Figure 2. Morphology of *Beauveria* spp. colonies grown during ten days on different culture media. A-CDA, B-CDA reverse, C-MC, D-SDA, E-MEA; LBb-IIIif: F-CDA, G-MC, H-SDA, I-MEA; LBb-1234: J-CDA, K-MC, L-SDA, M-MEA; LBb-76: N-CDA, O-MC, P-SDA, Q-MEA.

Tabla 4. Concentración de conidios de los aislados ensayados en diferentes medios de cultivos, transcurridos 10 días de incubación

Table 4. Conidia concentration of isolates in different culture media at ten days of incubation

Aislados	Concentración de conidios ( $10^9 \cdot \text{mm}^{-2}$ ) $\pm$ ES				
	SDA	PDA	MEA	CDA	MC
LBb-1234	0,98 $\pm$ 0,002a	0,38 $\pm$ 0,002b	0,47 $\pm$ 0,002b	0,35 $\pm$ 0,002c	0,85 $\pm$ 0,002a
LBb-76	0,79 $\pm$ 0,15a	0,16 $\pm$ 0,15cd	0,25 $\pm$ 0,15c	0,12 $\pm$ 0,15d	0,5 $\pm$ 0,15b
LBb-Cp2	0,58 $\pm$ 0,041a	0,30 $\pm$ 0,041b	0,55 $\pm$ 0,041a	0,14 $\pm$ 0,041b	0,63 $\pm$ 0,041a
LBb-IIIif	0,15 $\pm$ 0,08b	0,05 $\pm$ 0,08a	0,04 $\pm$ 0,08a	0,41 $\pm$ 0,08c	0,06 $\pm$ 0,08a

Las letras comunes en las filas indican que no hay diferencias significativas. Test de significación de Tukey  $p \leq 0,05$ .

Same letters in files means not significant differences in these variants. Tukey test  $p \leq 0.05$ .

Los medios de cultivos que indicaron un mayor valor de concentración de conidios fueron SDA, MC y MEA

en los aislados LBb-1234, LBb-76 y LBb-Cp2; sin embargo, en LBb-IIIif el mayor valor de concentración

se alcanzó en el medio Czapeck, el cual representó un medio de baja concentración de conidios para los demás aislados.

El aislado LBb-1234 fue el de mayor producción de conidios entre todos los aislados, y LBb-IIIIf el de menor concentración con respecto a los demás. Este aislado se caracteriza por un crecimiento en diámetro de la colonia superior al resto, sin embargo, produce abundante micelio y escasa producción de conidios.

La esporulación de cada aislado fue variable dependiendo del sustrato, lo cual presenta utilidad práctica, pues permite conocer los medios de cultivo que garanticen una mayor producción de conidios para cada aislado en particular, parámetro importante a considerar en el desarrollo de un microorganismo como bioplaguicida.

En los hongos los factores nutricionales más importantes para la esporulación son la concentración de nutrientes del medio de cultivo, fuente de carbono y nitrógeno, así como la relación carbono/nitrógeno (Onofre *et al.*, 2001; Zimmermann, 2007).

**Evaluación del crecimiento de los aislados a diferentes temperaturas**

La temperatura es un factor ambiental relevante para la eficacia de agentes microbianos fúngicos por incidir en su crecimiento vegetativo y persistencia en el campo.

Al respecto, Carrillo-Rayas y Blanco-Labra (2009) plantearon que este factor debe ser considerado como un punto de partida para la selección de aislados con potencial para el control biológico.

La Fig. 3 muestra los resultados del crecimiento de los aislados a las temperaturas ensayadas.

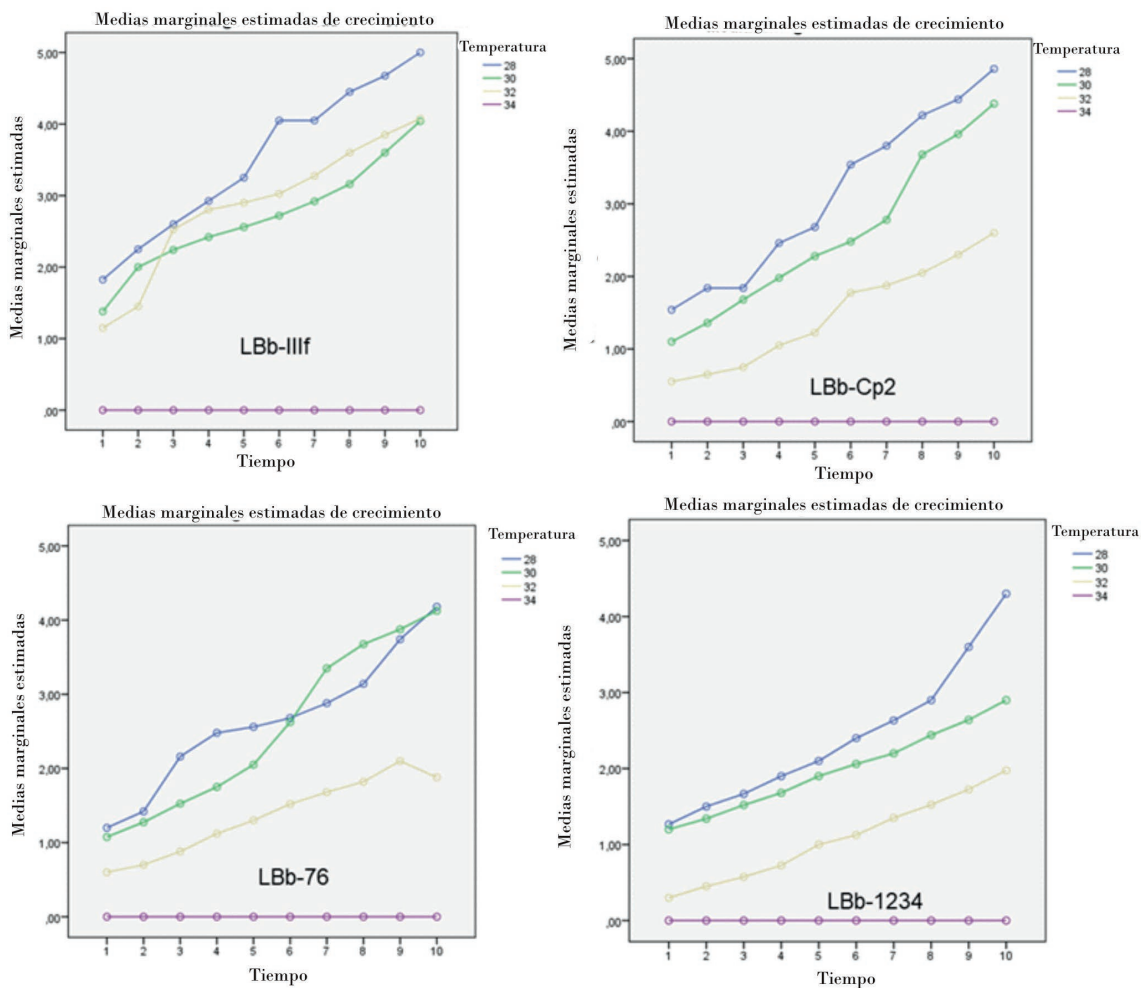
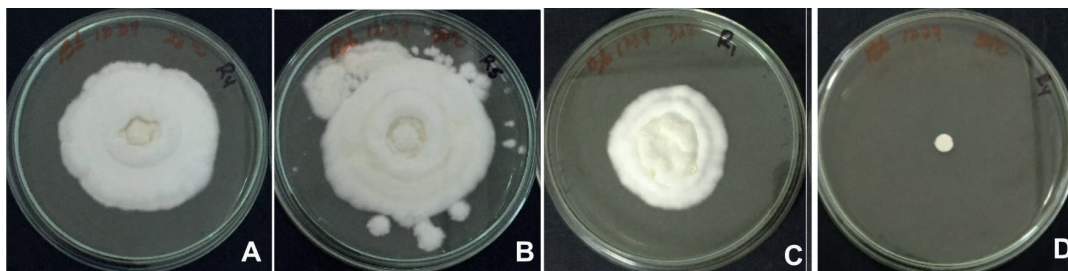


Figura 3. Crecimiento de la colonia de los aislados LBb-IIIIf, LBb-Cp2, LBb-76 y LBb-1234 a diferentes temperaturas.

Figure 3. Colony growth of isolates LBb-IIIIf, LBb-Cp2, LBb-76 and LBb-1234 at different incubation temperatures.

Las temperaturas en las cuales los aislados indicaron un mayor crecimiento fueron 28 y 30 °C. A 34 °C no hubo crecimiento en ninguno de los casos. El aislado LBb-IIIIf alcanzó mayor crecimiento micelial en todas las temperaturas, al contrario de LBb-1234, que fue el de menor crecimiento. En el aislado LBb-Cp2 se encontró diferencias significativas en todas las temperaturas ensayadas y fue el segundo mejor en cuanto al crecimiento.

En la *Fig. 4* se muestran las características del aislado LBb-1234 a las temperaturas ensayadas. A 28 °C y 30 °C este aislado presenta colonias de color blanco, algodonosas y con abundante crecimiento micelial. Alrededor de los 10 días de crecimiento se observa esporulación con formación de anillos concéntricos y producción de exudados. A 32 °C las características son similares, pero el diámetro de la colonia es menor y hay retardo en la maduración de los conidios. A 34 °C no se observa crecimiento.



*Figura 4.* Características culturales del aislado LBb-1234 a diferentes temperaturas. A: 28 °C, B: 30 °C, C: 32 °C, D: 34 °C (Fotos tomadas con cámara Sony DSC-S2000).

*Figure 4.* Cultural characteristics of LBb-1234 isolate at different temperatures. A: 28 °C, B: 30 °C, C: 32 °C, D: 34 °C (Pictures taken with digital camera Sony DSC-S2000).

Estudios previos realizados por Elosegú *et al.* (2006) informaron temperaturas óptimas para estos aislados entre 25 y 27 °C. Kumar *et al.* (2016) obtuvieron los valores mayores del crecimiento de la colonia a 28 y 32 °C. Sin embargo, a las temperaturas de 20 y 27 °C el crecimiento de las colonias de *Beauveria* fue menor. Estos mismos autores no observaron crecimiento a 35 °C para ninguna de las cepas evaluadas. También Benz *et al.* (2015) encontraron que en general la germinación

y el crecimiento puede ocurrir entre 5-35 °C, pero la temperatura óptima se encuentra entre 20-30 °C.

Con respecto al nivel de esporulación, a 28 °C se obtuvieron los mayores valores de concentración de conidios, con diferencias significativas respecto a 30 °C y 32 °C. De manera general los valores de este parámetro oscilaron entre  $1-6 \cdot 10^7$  conidios  $\cdot$  mm<sup>-2</sup>. El aislado LBb-1234 fue el que alcanzó mayor concentración (*Tabla 5*).

**Tabla 5. Concentración de conidios de los aislados a diferentes temperaturas**

**Table 5. Conidia concentration of isolates at different temperatures**

Aislados	Concentración de conidios ( $10^7 \cdot \text{mm}^{-2}$ )			
	28 °C	30 °C	32 °C	34 °C
LBb-1234	5,89 ± 0,02 a	2,22 ± 0,02 b	1,81 ± 0,02 b	0
LBb-76	2,69 ± 0,012 a	1,17 ± 0,012 b	1,13 ± 0,012 b	0
LBb-Cp2	5,21 ± 0,12 a	1,55 ± 0,12 b	1,29 ± 0,12 b	0
LBb-IIIIf	4,60 ± 0,054 a	1,95 ± 0,054 b	1,95 ± 0,054 b	0

Las letras comunes en las filas indican que no hay diferencias significativas. Test de significación de Tukey  $p \leq 0,05$ .

Same letters in files means not significance differences. Tukey test  $p \leq 0.05$ .

De acuerdo con Samson *et al.* (1988), los requerimientos de temperatura varían con la especie del hongo, y para los que se hallan en zonas tropicales y subtropicales la temperatura óptima oscila alrededor de los 25 °C. Según

McCoy *et al.* (1988) y Van Driesche y Bellows (1996), las temperaturas óptimas para el desarrollo, patogenicidad y sobrevivencia de los hongos, incluyendo a los hifomicetos entomopatógenos, fluctúan entre 20 y 30 °C.

### Evaluación cualitativa de la producción de enzimas extracelulares

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de producir disímiles compuestos extracelulares, algunos de los cuales son importantes biológicamente por provocar reacciones en otros organismos. Estos compuestos incluyen diferentes tipos de enzimas con

funciones determinadas en la patogenicidad. Básicamente las esporas germinadas tienen la habilidad de penetrar directamente la cutícula del insecto por hidrólisis enzimática (Fernandes *et al.*, 2012).

La *Tabla 6* muestra los valores promedios del índice de actividad enzimática evaluado para algunas enzimas hidrolíticas.

**Tabla 6. Índice de actividad enzimática de los aislados de *Beauveria* spp. estudiados**  
**Table 6. Enzymatic activity of *Beauveria* spp. isolates evaluated**

<i>Aislados</i>	<i>Índice de actividad enzimática</i>				
	<i>Proteasa</i>	<i>Amilasa</i>	<i>Lipasa</i>	<i>Caseínasa</i>	<i>Quitinasa</i>
LBb-76	1,73	–	1,0	1,0	–
LBb-Cp2	1,28	–	1,0	1,20	1,0
LBb-1234	1,13	–	1,0	1,0	–
LBb-IIIIf	1,36	–	1,0	1,1	1,0

La presencia de actividad proteasa, lipasa y caseinasa fue positiva para todos los aislados. En el caso de la enzima proteasa, el índice de actividad enzimática fue superior a 1; y en aquellos aislados que no se observó la formación de un halo definido, hubo abundante crecimiento micelial y posterior esporulación, teniendo en cuenta el crecimiento de los aislados en cada medio con el observado en el medio mínimo, no suplementado con el sustrato de la enzima.

En la producción de la enzima quitinasa se apreció un ligero crecimiento micelial, esporulación alrededor del ponchete y halos de hidrólisis en los aislados LBb-Cp2 y LBb-IIIIf, no siendo así para LBb-76 y LBb-1234 en las que no se apreció crecimiento alguno.

Estudios realizados por Fernandes *et al.* (2012) informaron la presencia de actividad lipasa, proteasa y caseinasa en varias cepas de *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, revelando la importancia de estas enzimas para la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. Los valores de índice de actividad enzimática encontrados por estos autores estuvieron en un rango de 1-2,5, y donde no se observó un halo de hidrólisis definido hubo abundante crecimiento micelial. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio.

La actividad lipasa se apreció en todas las cepas estudiadas por St. Leger *et al.* (1986), los que indicaron que esta enzima se produce en elevadas cantidades por las cepas de *Beauveria* y *Metarhizium*, demostrando la importancia de esta enzima en la virulencia de los entomopatógenos hacia los insectos susceptibles.

En relación con la producción de enzima amilasa, en ningún aislado se visualizó la producción de la misma. No se observó halos de hidrólisis, y el crecimiento micelial de los aislados fue escaso y similar al del medio mínimo. Estos resultados coinciden con los descritos por Murad *et al.* (2006), los que concluyen que esta enzima no es importante en el proceso patogénico porque la cutícula de los insectos no presenta almidón en su composición.

En la *Fig. 5* se pueden apreciar los resultados de la evaluación cualitativa de las enzimas hidrolíticas ensayadas.

Los hongos entomopatógenos producen un gran número de enzimas que son de utilidad para su acción sobre el hospedero, pues le permiten convertir los tejidos de los insectos en nutrientes para su crecimiento. Las enzimas son importantes en el proceso patogénico, porque permiten al patógeno coexistir con los procesos metabólicos asociados con los estados de enfermedad del hospedero. Las cutículas son muy poco utilizadas por la mayoría de los hongos, pero es indispensable su penetración para la completa invasión. Por tal motivo han desarrollado también un poderoso sistema enzimático con este fin, dentro del que se encuentra un amplio espectro de proteasas muy activas, necesarias además para la penetración de la epicutícula hidrofóbica. La variación en la virulencia se puede relacionar con la producción y actividad enzimática durante la penetración en la cutícula del hospedero (Saranraj y Jayaprakash, 2017).

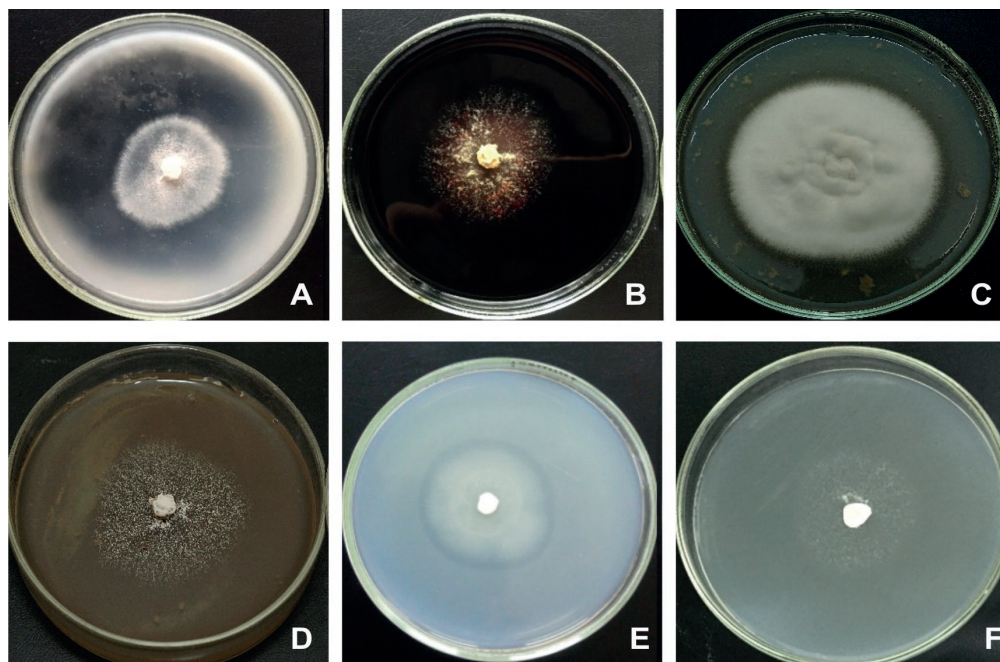


Figura 5. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de los aislados a los 10 días de incubación. A: Proteasa (LBb-76), B: Amilasa (LBb-1234), C: Caseinasa (LBb-76), D: Quitinasa (LBb-Cp2), E: Lipasa (LBb-76), F: Crecimiento en medio mínimo (LBb-IIIF) (Fotos tomadas con cámara Sony DSC-S2000).

Figure 5. Qualitative enzymatic activity of *Beauveria* isolates after 10 days of incubation. A: Protease (LBb-76), B: Amylase (LBb-1234), C: Caseinase (LBb-76), D: Chitinase (LBb-Cp2), E: Lipase (LBb-76); F: Growth in minimal culture media (LBb-IIIF) (Pictures taken with digital camera Sony DSC-S2000).

### Determinación de la patogenicidad de los aislados de *Beauveria* spp. sobre *Cylas formicarius*

La evaluación de la patogenicidad de los aislados hacia adultos de *C. formicarius* mostró la susceptibilidad del insecto, pudiéndose observar mortalidad en los individuos tratados con diferentes concentraciones del hongo.

A la concentración de  $1 \cdot 10^9$  conidios  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> todos los aislados lograron 100 %. El aislado LBb-1234 exhibió 100 % de mortalidad en todas las concentraciones en-

sayadas, en contraste con el resto, en las que se alcanzó valores entre un 34-96 % a las diferentes concentraciones, a los 15 días posteriores al tratamiento. El aislado LBb-76 fue el menos patogénico hacia *C. formicarius* con una mortalidad del 34 % a la concentración de  $10^6$  conidios  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

En la Fig. 6 se observa una cámara húmeda con la emergencia del hongo en la superficie, lo que indica la muerte de *C. formicarius* por la acción patogénica de los aislados de *Beauveria* evaluados.

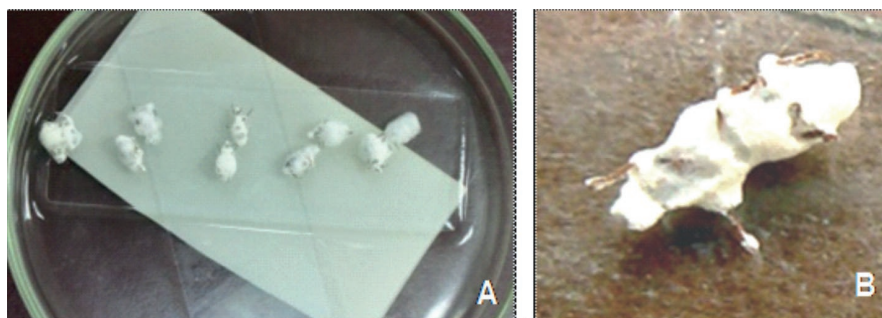


Figura 6. Cámara húmeda con individuos adultos de *C. formicarius* cubiertos por micelio del aislado LBb-1234. A: Observación a simple vista B: Observación al microscopio estéreo 40x (Foto tomada con cámara LGLS775).

Figure 6. Adults of *C. formicarius* in a humidity chamber with LBb-1234 mycelium on the body surface. A: Visual observation, B: stereo microscopic 40x observation (Pictures taken with digital camera LGLS775).

Durante el bioensayo la mortalidad de los insectos comenzó a registrarse a partir del tercer día de iniciado el tratamiento. Los tiempos letales  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  más bajos se registraron para el aislado LBb-1234 con 4,3

y 9,4 días, respectivamente, a una concentración de  $1 \cdot 10^8$  conidios  $\cdot mL^{-1}$ , lo que indica la alta virulencia de este aislado. La *Tabla 7* refleja la susceptibilidad del insecto a diferentes concentraciones de los aislados.

**Tabla 7.** Susceptibilidad de los adultos de *C. formicarius* a los aislados de *Beauveria*

**Table 7.** Susceptibility of *C. formicarius* adults to *Beauveria* isolates

Aislados	Concentraciones (conidios/mL)	$TL_{50}$ (días)	$TL_{90}$ (días)	Ecuaciones de regresión	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
LBb-1234	$1 \times 10^6$	11,1	13,5	$y = 2,44x + 0,16$	0,90
	$1 \times 10^7$	13,5	11,0	$y = 2,3x - 0,41$	0,75
	$1 \times 10^8$	4,3	9,4	$y = 1,47x + 0,44$	0,86
LBb-76	$1 \times 10^6$	12,6	14,7	$y = 2,08x - 0,46$	0,83
	$1 \times 10^7$	11,0	12,7	$y = 2,74x - 0,62$	0,70
	$1 \times 10^8$	5,7	11,6	$y = 2,4x + 0,24$	0,91
LBb-Cp2	$1 \times 10^6$	13,7	15,0	$y = 2,30x + 0,30$	0,89
	$1 \times 10^7$	9,1	14,6	$y = 3,06x - 0,48$	0,60
	$1 \times 10^8$	5,5	10,1	$y = 2,35x + 0,39$	0,80
LBb-IIIIf	$1 \times 10^6$	10,1	14,0	$y = 2,47x - 0,32$	0,89
	$1 \times 10^7$	7,5	13,7	$y = 2,46x + 0,12$	0,96
	$1 \times 10^8$	6,3	11,7	$y = 2,42x + 0,26$	0,91

Resultados similares obtuvo Reddy *et al.* (2014) al evaluar una cepa de *B. bassiana* y *Metarhizium brunneum*. Estos autores alcanzaron el 100 % de mortalidad contra este insecto a partir de 168-192 h posteriores al tratamiento. De manera análoga, otros estudios evaluaron la patogenicidad de cepas de *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana*, siendo esta última moderadamente virulenta a *C. formicarius* a concentraciones de  $1 \times 10^7$  conidios  $\cdot mL^{-1}$  y provocando el 50 % de mortalidad a los cuatro días posteriores al tratamiento (Hlerema y Eiasu, 2017). También Ondiaka *et al.* (2008) determinaron el efecto de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en adultos de *Cylas puncticollis*; ambos hongos provocaron entre el 62,5 % y 89,2 % de mortalidad contra esta especie.

La capacidad de esporulación del hongo sobre su hospedero es fundamental para la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo, lo que permite la reinfección a partir de los insectos muertos parasitados. El período requerido para matar al insecto es variable, dependiendo de la cantidad de esporas que se depositen sobre el mismo, la temperatura, la especie, el tamaño y la edad del insecto (Saranraj y Jayaprakash, 2017).

Otro aspecto importante para considerar son las relaciones entre la patogenicidad de los aislados y

su hospedante de origen. En este caso los aislados estudiados provienen de *H. hampei*, lo que puede influir en la susceptibilidad de *C. formicarius*. Según Zimmermann (2007), los hongos entomopatógenos no aparecen estrechamente ligados a una especie, género o grupo de hospedante homogéneo taxonómicamente. Este aspecto ha sido discutido por varios autores, los que señalan que una cepa puede ser más o menos virulenta contra otros insectos no huéspedes (Imoulan *et al.*, 2017).

Algunos autores refieren que el criterio primario para la selección de un aislado como micro-insecticida se basa en su virulencia determinada por ensayos de laboratorio (Reay *et al.*, 2008). Sin embargo, Ibarra-Cortés *et al.* (2013) y Senthil Kumar *et al.* (2015) enfatizan no solo en la virulencia, sino también en su capacidad de adaptación a las condiciones abióticas en las que vive la plaga.

En este análisis se observó diferencias en la patogenicidad de los cuatro aislados estudiados, lo que se manifestó en el porcentaje de mortalidad y los tiempos letales. Aunque estos ensayos se realizan en condiciones óptimas, lo cual no refleja las condiciones naturales encontradas en el campo, son de utilidad para la selección de cepas promisorias.

La variación en la virulencia se atribuye a varios factores, entre los que se incluyen el origen geográfico del aislado, la fuente del aislamiento, la variabilidad genética, los subcultivos en medio artificial, la susceptibilidad de hospedantes y las diferencias en la secreción de enzimas hidrolíticas (Perinotto *et al.*, 2014).

**Reproducción a escala piloto del aislado LBb-1234 por método bifásico**

La producción a gran escala de cepas de *Beauveria* y otros hongos entomopatógenos mediante fermentación sobre sustrato sólido sigue siendo un método eficiente para el desarrollo de bioplaguicidas y su utilización en las estrategias de control biológico.

La obtención de conidios aéreos sobre un sustrato sólido, utilizando principalmente granos de cereales

como el arroz y que involucra el crecimiento del hongo en dos fases, de líquido a sólido o de sólido a sólido, es un proceso relativamente fácil, aunque laborioso, pero muy utilizado como producción artesanal de baja tecnología (Mascarín y Jaronski, 2016).

La selección del aislado LBb-1234 para evaluar su reproducción sobre el sustrato cabecilla de arroz tuvo en cuenta su elevada patogenicidad sobre *C. formicarius*, así como los niveles de concentración de conidios obtenidos en los diferentes ensayos.

La Tabla 8 muestra los valores de concentración y viabilidad del cultivo madre del aislado LBb-1234 para preparar el inóculo y la concentración de blastosporas obtenida transcurridas 48 h de agitación en zaranda orbital.

**Tabla 8: Control de calidad del aislado utilizado en el ensayo de producción sobre sustrato sólido**

**Table 8. Quality control of isolates used for solid substrate production assays**

Aislado	Concentración (conidios • mL <sup>-1</sup> )	Viabilidad (%)	Concentración (blastosporas • mL <sup>-1</sup> )	Pureza
LBb-1234	9,7 x 10 <sup>8</sup>	100	1,06 x 10 <sup>8</sup>	Conidios típicos del género <i>Beauveria</i> No se observan microorganismos contaminantes

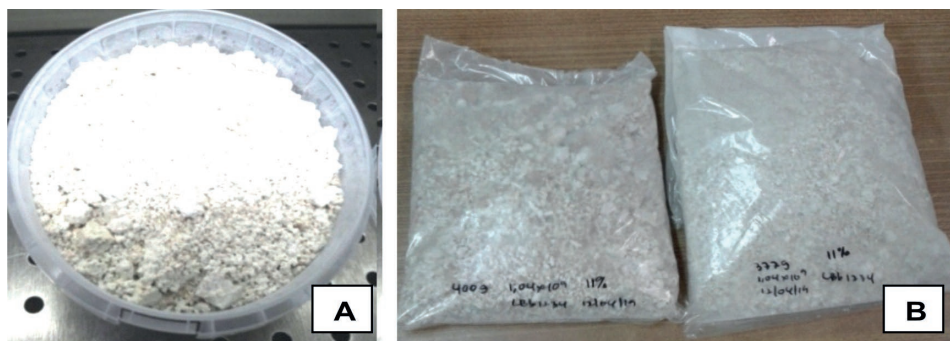
El cultivo original del hongo desde el cual se inició el lote de producción y el inóculo estaban puros, sin presencia de otros microorganismos contaminantes.

El proceso de producción hasta lograr la esporulación del hongo sobre el sustrato y alcanzar la concentración deseada duró 11 días, y el proceso de secado cuatro. La Fig. 7 muestra el recipiente utilizado en la reproducción del hongo con el sustrato cabecilla de arroz

colonizado por los conidios del aislado LBb-1234, previo al proceso de secado.

Una vez concluido el secado del producto, se analizó la calidad del mismo, comprobándose que la reproducción del aislado fue apropiada y cumplió los requisitos deseados para este tipo de tecnología.

La producción obtenida se envasó en bolsas de polipropileno y se guardaron a 4 °C para ensayos posteriores de patogenicidad en condiciones de campo.



**Figura 7. A: Sustrato cabecilla de arroz con el crecimiento del aislado LBb-1234 a los 11 días de incubación. B: Producto de Beauveria envasado en bolsas de polipropileno.**

**Figure 7. A: Rice substrate with LBb-1234 colonization after 11 days of incubation. B: Beauveria product in polypropylene bags.**

La *Tabla 9* refleja los datos obtenidos del control de la calidad del producto una vez concluido el proceso de producción.

**Tabla 9. Control de calidad del bioproducto obtenido**

**Table 9. Quality control of *Beauveria* product obtained**

<i>Aislado</i>	<i>Ensayos de calidad</i>		
	<i>Concentración (conidios • g<sup>-1</sup>)</i>	<i>Viabilidad (%)</i>	<i>Humedad (%)</i>
LBb-1234	1,04 x 10 <sup>9</sup>	100	11,06

En la evaluación de la pureza del producto final no se observó la presencia de otros microorganismos. Las UFC • g<sup>-1</sup> correspondieron únicamente con colonias de *Beauveria*.

Los parámetros de calidad evaluados en el producto final están dentro de los valores permisibles de la Norma Cubana NC 1016: 2014 para biopreparados de entomopatógenos, que establece los siguientes indicadores:

- Concentración:  $\geq 1 \times 10^8$  conidios • g<sup>-1</sup>
- Viabilidad:  $> 85 \%$
- Pureza:  $\leq 10^5$  UFC • g<sup>-1</sup>
- Humedad:  $\leq 12 \%$

Aunque solo se produjo y evaluó un lote de producción en el que se obtuvo 2767 g del producto de *Beauveria*, se comprobó que el aislado LBb-1234 se reproduce bien sobre este sustrato y con una elevada concentración de unidades infectivas.

Resultados sobre este tipo de producciones en diferentes países documentan que la fermentación sobre sustrato sólido es el método de producción más utilizado y con el cual se obtienen concentraciones en el orden de 10<sup>9</sup> conidios • g<sup>-1</sup>, principalmente de los entomopatógenos *Beauveria* y *Metarhizium*. Algunos países como Rusia producen anualmente 22 t de *B. bassiana*, logrando concentraciones de alrededor de 6,9 x 10<sup>9</sup> conidios • g<sup>-1</sup> (Mascarin y Jaronski, 2016). Por su parte, Li et al. (2010) informan que en Brasil este método es el principal sistema de producción de conidios, donde se produce *Beauveria* sobre sustrato de arroz por este método, logrando aproximadamente 10 t de conidios puros. Este producto se aplica en plantaciones de café y eucalipto para el control de diferentes plagas como thrips, mosca blanca, áfidos y saltahojas.

Debido a los efectos desfavorables del cambio climático y al proceso continuo de diversificación agrícola, se están produciendo cambios importantes en las manifestaciones de las plagas, así como en la eficacia y persistencia de los productos en el campo. Por tal motivo se hace necesario seleccionar cepas más tolerantes y adaptadas a los ecosistemas actuales. La selección de nuevos aislados de *Beauveria* permitirá garantizar nuevos agentes de biocontrol contra determinadas plagas, reemplazar una cepa cuando se detecten problemas productivos y la posibilidad de emplear cepas nativas o mejor adaptadas a las condiciones de determinada región, para garantizar un control biológico más eficiente.

En la presente investigación las diferencias en las características estudiadas, así como la poca variabilidad observada en algunos caracteres como la morfometría de los conidios, demuestra la importancia del empleo de métodos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y patogénicos para la selección de cepas promisorias como agentes de control biológicos. Por otro lado, aunque las metodologías de reproducción en sustratos económicos para la obtención de abundantes unidades infectivas son conocidas y poco complejas, la evaluación de cada aislado es fundamental. Esto es elemental para el conocimiento básico de las cepas, el escalado y su posterior uso y aplicación, y el desarrollo de bioproductos con un alto impacto en el control de plagas agrícolas.

## CONCLUSIONES

- Las características morfoculturales de los aislados estudiados fueron similares. Los medios de cultivo Agar Dextrosa de Saboraud, Extracto de Malta y Medio Completo, así como las tem-

peraturas de 28 °C y 30 °C fueron favorables para la esporulación, destacándose el aislado LBB-1234.

- En todos los aislados se constató la producción de las enzimas hidrolíticas, lipasa, proteasa y caseinasa.
- Los aislados de *Beauveria* evaluados mostraron actividad patogénica hacia el insecto *Cylas formicarius*. LBB-1234 resultó la más virulenta con  $TL_{50}$  y  $TL_{90}$  de 4,3 y 9,4 días, respectivamente.
- La obtención de un bioproducto a partir del aislado LBB-1234 mediante tecnología bifásica cumplió los parámetros establecidos en la Norma Cubana NC 1016: 2014 para biopreparados de entomopatógenos.

## REFERENCIAS

- Benz, G. 2015. Environment, In: Epizootiology of Insect Diseases. J. R.Fuuxa y Y. Tanada. (Eds.) Wiley & Sons, New York: 177-214.
- Carrillo-Rayas M. y Blanco-Labra A. 2009. Potencial y algunos mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Universitaria*, 19 (2): 40-49.
- Chan-Cupul W., Ruiz E., Cristóbal J., Pérez A., Mungía R. y Lara R. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Agrociencia*, 44(5): 587-597.
- Elósegui O., Jiménez J., Car A. 2006. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitosporicos con potencialidades para el control de especies de insectos plaga. *Fitosanidad*, 10(4): 265-267.
- Fernández E., Valerio H., Feltrin T., Van Der Sand S. 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 827-833.
- Ibarra-Cortés K., Guzmán F., González H., Suárez E. y Baverstock, J. 2013. Selection of a fungal isolate for the control of the pink hibiscus mealybug *Maconelli coccis hirsutus*. *Pest Manag. Sci.* 69: 874-882.
- Imoulan A., Hussain M., Kirk P., El Meziane A. y Yi Jian Y. 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., Hai-Jun W., Wei-Lai L., Yi L., Bin L., Rei Y., Wen-Jing W. Xiao-Liang W., Paul M. y Yi-Jian Y. 2016. *Beauveria medogensis* ssp. nov, a new fungus of the entomopathogenic genus from China. *J. Invertebr. Pathol.* 139: 74-81.
- Khonsanit A., Luangsa-ard J. Thanakitpipattana D., Noisripoom W., Chaitika T. & Kobmoo N. 2020. Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. *Mycol Progress* 19:291-315.
- Kumar C., Jacob T., Devasahayam S. y D'Silva S. 2016. Characterization and virulence of *Beauveria bassiana* associated with auger beetle (*Sinoxylonanale*) infesting allspice (*Pimenta dioica*). *J. Invertebr. Pathol.* 139:67-73.
- Lacey A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D. I., Frutos R., Brownbridge M. y Goettel M. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- Lang W., Lung I., How C., Choan K., Teish W., Kuo Y., Jon J. y Lu C. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and microbial Technology*. 31: 321-328.
- Li Z., Alves S., Roberts D., Fan M., Delalibera I., Tang J., Lopes R., Faria M. y Rangel D. 2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Technol.* 20: 117-136.
- Liu H., Skinner M., Bridge M. y Parker B. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.* 82: 139-147.
- Márquez M., Fernández-Larrea O., Jiménez J., Elósegui O., Gómez R., Carreras B., Laguardia E., Monzón S., Ayala J., Massó E., Veitia M., Borges G. y Baró Y. 2010. Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del Minag: 34-35.
- Mascarin G. y Jaronski S. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol.* 32,177. DOI:10.1007/s11274-016-2131-3.
- Murad A., Laumann R. Lima T., Sarmiento R., Noronha E., Rocha T., Valadares-Inglis M. y Franco O. 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp. Biochem. Physiol.* 142(3): 365-367.
- Norma cubana NC1016: 2014. Biotecnología agrícola. Métodos de ensayos para biopreparados de entomopatógenos. Oficina Nacional de Normalización.
- Obando J., Bustillo A., Castro U., Mesa N. 2013. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 39(1): 26-33.
- Ondiaka S., Maniana N., Nyamasy G., Nderitu J., Onofre S. Miniuk C., Monteiro N. y Azevedo J. 2001. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimens. *Scientia Agricola*. 58 (3): 613-616.
- Paccola-Meirelles L. y Azevedo J. 1990. Variabilidad natural no fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. *Arq. Biol. Tecnol.* 33(3):657-672.
- Paddy L., Villalba M., Ravelo H. y Cupull S. 2009. Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. *Centro Agrícola*. 36(4): 25-32.
- Perinotto W., Golo P., Coutinho C., Sa F., Santi L., Beys da Silva W., Jungues A., Vainteins M., Schrank A., Salles C. y Bittencourt V. 2014. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 203: 189-196.
- Reddy G., Zhao Z. y Humber R. 2014. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). *J. Invertebr. Pathol.* 122: 10-15.
- Rehner S. y Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. *Mycologia*. 97: 84-98.
- Rehner S., Minnis A., Sung G., Luang-sard J., Devotto L. y Humber R. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*. 103: 1055-1073.
- Rehner S., Posada F., Buckley E., Infante F., Castillo A. y Vega F. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s. l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 11-21.
- Sanivada S. y Challa M. 2014. Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. *J. Biopest.* 7: 33-37.
- Saranraj P. y Jayaprakash A. 2017. Agrobeneficial entomopathogenic fungi – *Beauveria bassiana*: A review. Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR). 3 (2): 1051- 1087 DOI: 10.22192/iajmr.2017.3.2.4
- Senthil Kumar C., Jacob T., Devasahayam S., D'Silva S., Jinsha J. y Rajna S. 2015. Occurrence and characterization of a tetrahedral-

- nucleopolyhedrovirus from *Spilarctia oblique* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.* 132: 135-141.
- Senthil Kumar C., Jacob T., Devasahayam S., D'Silva S. y Nandeesh P. 2016. Characterization and virulence of *Beauveria bassiana* associated with auger beetle (*Sinoxylon anale*) infesting allspice (*Pimenta dioica*). *J. Invertebr. Pathol.* 139: 67-73.
- St Leger R., Joshi L. y Roberts D. 1997. Adaptation of proteases, carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic, and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology.* 143: 1983-1992.
- Valero-Jiménez C., Wieggers H., Zwaan B., Koenraadt C. y Van Kan J. 2016. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 133: 41-49.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology.* 17 (9): 879-920.

## SERVICIOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS

ofrecidos por el

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE SANIDAD VEGETAL

INISAV



- Análisis físico-químico de plaguicidas.
- Análisis de residuos y contaminación ambiental por plaguicidas.
- Monitoreo y determinación de fungo e insectorresistencia.
- Asistencia técnica sobre reproducción y liberación de entomófagos.
- Asistencia técnica sobre reproducción y utilización de bioplaguicidas.
- Diagnóstico cuarentenario y evaluación de riesgos.
- Diagnóstico de agentes causales de enfermedades causadas por virus, hongos y bacterias.
- Diagnóstico entomológico, acarológico y nematológico.
- Control de roedores.
- Asistencia técnica sobre manejo integrado de plagas, enfermedades y malezas.
- Servicio de cuarentena para introducciones de entomófagos.
- Venta de inmunosueros de bacterias fitopatógenas.