

# COMPORTAMIENTO DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. CEPA LBB-1 EN AGAR SABOURAUD DEXTROSA PRODUCIDO EN CUBA

Orestes Elósegui, Carmen Nieves, Raysa Díaz, Noris Bel Padrón y Aidanet Carr

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F. Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600 c.e.: [acarr@inisav.cu](mailto:acarr@inisav.cu)

## RESUMEN

*Beauveria bassiana* cepa LBB-1 es uno de los hongos más usados en Cuba como control biológico de plagas de insectos. A partir de 1998, con la introducción de Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) producido en Cuba, se presentaron quejas en los laboratorios provinciales de sanidad vegetal sobre el comportamiento de esta especie fúngica en este medio de cultivo. Por ello se decidió estudiar las siguientes variables: diámetro de la colonia, título de conidios en tubos, título de conidios en arroz y conservación de cultivos en cuñas de agar a 9°C. Los valores de las variables obtenidos estuvieron dentro del rango permisible según NC 7205 sobre la calidad de biopreparados de *B. bassiana*. Se recomienda realizar bioensayos con una especie blanco sobre la cual se aplica el biopreparado con conidios obtenidos de inóculos crecidos en el medio agarizado de producción nacional. Si el resultado con los bioensayos es adecuado, no se tendrían entonces evidencias experimentales para desaconsejar el uso del medio de producción nacional.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, hongos entomopatógenos, Agar Sabouraud Dextrosa, conidios

## ABSTRACT

*Beauveria bassiana* strain LBB-1 is one of the most widely used entomopathogenic fungi as a biological control of insect pests in Cuba. Since 1998 with the introduction of the Cuban Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) into the Provincial Plant Health Laboratories, the specialists have been complaining about its quality for culturing LBB-1. For that reason the following variables were studied: colony size, conidia yield on agar slants, conidia yield on rice and culture conservation on SDA agar slopes at 9 °C. The results obtained were within the permissible range described by the Cuban standard for *B. bassiana* biopesticide production. It is strongly recommended to carry out bioassays on a target pest using conidia obtained from the Cuban SDA conidial inocula. If the results obtained are good there would not be any evidence to refuse the Cuban SDA use.

Key words: *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungi, Sabouraud's Dextrose Agar, conidia

## INTRODUCCIÓN

*Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más usados a nivel mundial como control biológico debido a su estabilidad fuera del hospedante, su amplio rango de hospedantes y su facilidad para producir epizootias en condiciones naturales [Lecuona, 1996; Moore *et al.*, 1996].

En Cuba hace más de treinta años que comenzaron los primeros ensayos con este entomopatógeno, y actualmente se produce con gran calidad [Linares y Pérez, 1995]. El método de reproducción más empleado se utiliza como substrato sólido cabecilla de arroz fundamentalmente.

La cepa de *Beauveria bassiana* más extendida en la producción es LBB-1. Anualmente se entrega una réplica de transferencia 1 a los laboratorios provinciales de sanidad vegetal con el fin de que estos la repliquen y a su vez entreguen la cepa a los Centros Reproductores (CREE).

Desde 1998 se presentan quejas sobre la calidad de la cepa cuando es cultivada en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) producido en Cuba. Para dilucidar este problema se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar el crecimiento de la colonia en placa.
2. Cuantificar el nivel de esporulación de LBB-1 en tubos con SDA de primera, segunda y tercera transferencias.
3. Cuantificar el nivel de esporulación en cultivos sometidos a las condiciones de producción y obtenidos con inóculos procedentes de cultivos de primera, segunda y tercera transferencias en SDA.
4. Cuantificar el porcentaje de germinación de conidios de LBB-1 mantenidos en SDA como medio de conservación a 9°C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los experimentos se usó la cepa de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. LBB-1 procedente de la micoteca del INISAV. Se trabajó con un lote de Agar Sabouraud Dextrosa de producción nacional, del cual un laboratorio provincial refería quejas. En todos los casos se trabajó con un control de Agar Sabouraud Dextrosa procedente de una firma internacionalmente reconocida.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C en autoclave por 15 minutos. Previamente la acidez del medio fue ajustada a un pH = 5,6.

- El crecimiento de la colonia se determinó tomando de una placa con el cultivo del hongo de primera transferencia un disco circular de 6 mm y colocándolo en el centro de otra placa. Esta se incubó a 27°C en la oscuridad. Las mediciones del radio de la colonia se realizaron desde los tres hasta los 16 días. Se hicieron cinco réplicas.
- Para cuantificar el nivel de esporulación en tubo se realizaron siembras. Se obtuvieron cultivos de primera, segunda y tercera transferencias. Estos se incubaron a 27°C en la oscuridad por 16 días. Transcurrido este tiempo se resuspendió el cultivo de cada tubo en agua con tween 80 al 0,01%, agitándose alrededor de 10 minutos. Se realizaron diluciones decimales y se procedió al conteo en cámara de Neubauer.
- Para determinar el título de conidios en condiciones de producción se vertieron 100 g de cabecilla de arroz en frascos de cristal de 500 mL y se esterilizaron por 40' a 1,5 atm. Se prepararon inóculos con una suspensión de conidios a una concentración de  $10^7$  conidios/mL con tween 80 al 0,01%. Se tomaron 40 mL y se sembraron en los frascos. Los conidios según el caso se obtuvieron de cultivos de primera, segunda y tercera transferencias. Los frascos se incubaron en un cuarto climatizado (23-27 °C) por 16 días. Transcurrido este período se tomó 1g del cultivo sobre arroz por frasco, se realizaron diluciones decimales en agua destilada más tween 80 al 0,01% y se procedió al conteo de conidios.
- Para evaluar la conservación del cultivo en cuñas de agar se tomaron cinco tubos de cada transferencia (1, 2 y 3) y se incubaron a 9° C. Transcurrido un tiempo de almacenaje de cuatro meses y 15 días, de tres meses y 21 días y tres meses para los cultivos de transferencia 1, 2 y 3 respectivamente, se procedió a realizar una prueba de germinación. Para esto se tomó con un asa mediante raspado conidios de los cultivos y se resuspendieron en agua destilada estéril con tween 80% al 0,01%. De esta suspensión se sembró 0,1 mL en PDA sobre portaobjetos en cámaras húmedas. Se incubó a temperatura ambiente (24-30 °C) y se halló el porcentaje de germinación a las 20 horas. Se contaron 100 conidios por muestra de cada tubo. Los conidios contados como germinados fueron aquellos en los que el tubo germinativo estaba presente.

A los resultados experimentales se les hallaron las correspondientes medias. Se realizaron Análisis de Varianza  $p < 0,01$ , y las medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan  $p < 0,05$ . Los datos expresados en porcentajes de germinación se transformaron a  $2\arcsen x^{1/2}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En placa no se obtuvieron diferencias significativas entre los transferencias ni entre los medios, fluctuando el diámetro de la colonia entre 31 y 37 mm; sin embargo, sí se aprecia interacción debido a un crecimiento máximo observado en el cultivo de transferencia 2 de SDA de procedencia extranjera y un crecimiento mínimo en transferencia 1 de SDA de procedencia extranjera. No obstante, los valores no difieren lo suficiente para considerarlos como un efecto del medio (A) y la transferencia (B) sobre el crecimiento radial de la colonia. (F (B) = 1,8 ns ; F (A) = 3,2 ns; F (A x B) = 5,5\*\* (véase *Tabla 1*). Los bordes de las colonias se presentaron algo irregulares en SDA de producción nacional con respecto a SDA de procedencia extranjera. El micelio se tornó más abundante (colonias aterciopeladas), y se observó un retardo de la apariencia crema polvorienta en SDA de producción nacional, la que aparece en el hongo cuando comienza a esporular. Se observaron la forma y tamaños típicos de los conidioforos, fiálides y conidios de *Beauveria bassiana* cepa Bb-1 en ambos medios.

Se ha observado que el desbalance entre las fuentes carbonadas y nitrogenadas es el principal factor que afecta el crecimiento del hongo. Así, cuando las fuentes que aportan nitrógeno N en el medio (ejemplo el extracto de levadura) están dos o más veces concentradas con respecto a la fuente carbonada (ejemplo la dextrosa), se estimula el crecimiento micelial [Jenkins and Prior, 1993].

**Tabla 1. Diámetro de las colonias de LBB-1 en SDA de procedencias nacional y foráneo a los dieciséis días.**

	SDA nacional (mm)	SDA foráneo (mm)
Transferencia 1	34 ± 2 ab	32 ± 3 a
Transferencia 2	37 ± 3 bc	39 ± 2 c
Transferencia 3	35 ± 2 abc	33 ± 2 ab

En tubos el nivel de esporulación estuvo en el orden de  $10^8$  conidios/mL. A pesar de existir diferencias significativas entre los medios, teniendo valores superiores el medio de procedencia extranjera, el nivel de conidiogénesis es adecuado para este microorganismo según la norma cubana NC 7205 (*Tabla 2*).

**Tabla 2. Título de conidios de LBb-1 en tubos de cultivo de SDA nacional y SDA foráneo.**

	SDA nacional (con./mL)	SDA foráneo (con./mL)
Transferencia 1	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^8$ a	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^8$ ab
Transferencia 2	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^8$ bc	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^8$ c
Transferencia 3	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^8$ bc	$(3,0 \pm 0,4) \times 10^8$ c



*Figura 1. Beauveria bassiana* cepa LBb-1 de transferencia 1 en tubos. Nótese el abundante crecimiento micelial en el tubo superior que contiene SDA nacional.

El efecto antes explicado del balance de las fuentes carbonadas y nitrogenadas en el medio es muy marcado en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Se ha demostrado que el agotamiento de la fuente nitrogenada y al mismo tiempo el exceso de la fuente carbonada constituye de alguna forma el estímulo fisiológico para que en la célula se dispare el mecanismo esporulativo. Cuando el nitrógeno está en exceso de forma que en la cinética de crecimiento no se llegue a agotar, la esporulación no ocurre [Jenkins and Prior, 1993]. Algunas veces, aunque de forma errática, aparecieron tubos con exceso de crecimiento micelial según se observa en la Fig. 1.

Para los cultivos de *B. bassiana* LBb-1 en cabecilla de arroz con inóculos conidiales procedentes de cultivos en SDA foráneo se obtuvo que no hay diferencias significativas, de acuerdo con el título de conidios, entre ninguna de las transferencias; sin embargo, en el caso de los inóculos procedentes de conidios obtenidos en SDA de procedencia nacional, el título conidial es estadísticamente diferente entre la transferencia 1 y las transferencias 2 y 3. En los cultivos inoculados con conidios de transferencia 2 y 3 obtenidos de cultivos de SDA nacional, a pesar de existir diferencias, el nivel de conidiogénesis se mantiene a un nivel adecuado, según NC 7205, a los 16 días. El arroz es un substrato ideal para la reproducción del hongo, donde la fuente carbonada predominante es el almidón (fuente carbonada) [Barbosa y Goncalves, 1986; López, 1993; Jenkins y Goettel., 1997]. Es interesante observar cómo el título de conidios logrado en cabecilla de arroz con

inóculos procedentes de transferencia 2 y transferencia 3 es la tercera parte del alcanzado para el de transferencia 1 en el caso de inóculos conidiales provenientes de SDA nacional. Podría de alguna forma influir la calidad del conidio usado en las inoculaciones en el título final de conidios obtenido en cabecilla (ver *Tabla 3*).

En relación con la conservación de cultivos a 9 °C, se obtuvo en el control (tiempo de conservación = 0) de transferencia 1, transferencia 2 y transferencia 3 un porcentaje de germinación superior al 98%.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de LBb-1 entre el SDA nacional y el foráneo a los tiempos probados dentro de cada transferencia. El ANOVA que se realizó con las medias de transferencia 1 dio un valor de  $F = 0,66$  n.s. Para las medias de transferencia 2 se obtuvo  $F = 5,97$  n.s. y para las medias de transferencia 3 se obtuvo un valor de  $F = 0,66$  n.s. Estos resultados se obtuvieron por el test de germinación. Entre las transferencias se observó cómo a medida que transcurrió el tiempo de conservación la viabilidad de los conidios decayó, aunque no fue nuestro objetivo demostrar si existían o no diferencias estadísticas (ver *Tabla 4*). Esto sería un resultado esperado, ya que independientemente de la calidad de un medio, la conservación en cuñas de agar refrigeradas es un método que trae como resultado una disminución rápida en el tiempo de la viabilidad de los conidios [Lecuona, 1996].

**Tabla 3. Esporulación de LBb-1 en arroz con inóculos procedentes de conidios obtenidos en SDA nacional y foráneo.**

	SDA nacional (con./g)	SDA foráneo(con./g)
Transferencia 1	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^9$ a	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$ a
Transferencia 2	$(0,3 \pm 0,1) \times 10^9$ b	$(0,9 \pm 0,3) \times 10^9$ a
Transferencia 3	$(0,4 \pm 0,2) \times 10^9$ b	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^9$ a

Está muy bien demostrado que la sobrevivencia de los conidios de los hongos entomopatógenos hifomicetos se ve muy influenciada por las características del medio de cultivo [Lane y col., 1991]. Estos autores encontraron que blastosporas de *B. bassiana* formadas en cultivos donde el carbono era la fuente limitante tenían un tiempo de conservación significativamente más corto que aquellas derivadas de cultivos donde el nitrógeno era la fuente limitante. Por otra parte, Moore y Higgins, en 1997, en un estudio con varios aislados de *Metarhizium*, demostraron que no es suficiente con tener un título de conidios adecuado en un determinado medio, sino también su ca-

lidad. Ellos encontraron que los conidios desarrollados en medios con fuentes limitantes de carbono perdían más rápido su viabilidad. Este hecho fue observado también en conidios que fueron precultivados con una baja relación C:N para luego ser inoculados en arroz. Los conidios obtenidos en esta generación tenían un peor comportamiento en cuanto al tiempo de conservación.

El comportamiento de *B. bassiana* LBb-1 pensamos se deba a una peculiaridad del SDA nacional en relación con el balance C:N.

La formulación para ambos medios es la siguiente:

<i>SDA nacional</i>	<i>SDA foráneo</i>
Dextrosa: 40 g/L	Dextrosa: 40 g/L
Peptona bacteriológica: 5,0 g/L	Peptona carne: 5;0 g/L
Hidrolizado enzimático caseína: 5,0 g/L	Peptona de caseína: 5,0 g/L
Agar 1: 15,0 g/L	Agar 1: 15,0 g/L

Se sabe que siempre hay ligeras diferencias entre los suministradores de las materias primas en la elaboración de cualquier producto industrial. Para la peptona micológica foránea probada se hace énfasis en que es rica en carbohidratos, por lo que este medio podría tener más carbohidratos totales que el nacional; sin embargo, esto es pura especulación, porque no contamos

con las cantidades de N total y C total del medio nacional. En la literatura consultada no se refieren a la posibilidad de que un exceso de N amino retarde la esporulación o estimule el crecimiento micelial, y nosotros tampoco tenemos este dato del medio SDA nacional. No obstante, sí se observaron ligeras diferencias entre ambos medios.

**Tabla 4. Porcentajes de germinación obtenidos de conidios de LBb-1 almacenados a 9°C en SDA nacional y SDA foráneo.**

	SDA nacional	SDA foráneo
Transferencia 1 (135 días)	$75 \pm 5$	$78 \pm 4$
Transferencia 2 (111 días)	$85 \pm 3$	$72 \pm 9$
Transferencia 3 (90 días)	$90 \pm 7$	$94 \pm 3$

## CONCLUSIONES

- El crecimiento radial de la colonia en *B. bassiana* LBb-1 no se afectó en SDA de procedencia cubana con respecto a SDA foráneo, tomado como control hasta los 16 días.
- El crecimiento micelial y la formación de coremios se estimuló tanto en placas como en tubos en SDA de origen cubano.
- *Beauveria bassiana* LBb-1 alcanzó un nivel de esporulación adecuado en tubo en SDA de procedencia nacional a los 16 días del orden de  $10^8$  con./mL.
- En el cultivo de cabecilla de arroz inoculado con conidios de transferencia 2 y transferencia 3 formados en SDA de origen cubano se obtuvo tres veces menos concentración de esporas con respecto al de transferencia 1, aunque por razones prácticas esto sea aceptable.
- No hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación en tubos conservados a 9°C en SDA cubano con respecto al foráneo dentro de cada transferencia a los tiempos probados.

## REFERENCIAS

- Barbosa, R.; F. Goncalves: «Esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en diferentes meios de cultura naturais», *ENGOPA-Pesquisa en andamento*, nov. 1986.
- Jenkins, N. E.; C. Prior: «Growth and Formation of True Conidia by *Metarhizium flavoviride* in a Simple Liquid Medium», *Mycol. Res.* 97(12):1489-1494, 1993.
- Jenkins, N. E.; M. S. Goettel: «Methods for Mass Production of Microbial Control Agents of Grasshoppers and Locusts», *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 71: 37-48, 1997.
- Lane, B. S.; A. P. Trinci A. T. Gillespie: «Endogenous Reserves and Survival of Blastospores of *Beauveria bassiana* Harvested from Carbon and Nitrogen Limited Batch Cultures», *Mycol. Res.* 95, 821-28, 1991.
- López, Miriam: «*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: caracterización, reproducción y obtención de un biopreparado con efecto nematocida». Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, 1995.
- Moore, D.; P. M. Higgins; C. J. Lomer: «Effects of Simulated and Natural Sunlight on the Germination of Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and Interactions with Temperature», *Biocontrol Science and Technology* 6: 63-76, 1996.
- Moore, D.; P. M. Higgins: «Viability of Stored Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, Produced Under Differing Culture Regimes and Stored with Clays», *Biocontrol Science and Technology* 7, 335-43, 1997.
- NC 72-05: «Biopreparado del entomopatógeno *Beauveria bassiana*». Especificaciones. Biotecnología Agrícola, 1993.