

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS MITOSPÓRICOS CON POTENCIALIDAD PARA EL CONTROL DE ESPECIES DE INSECTOS PLAGA

Orestes Elósegui Claro, Jesús Jiménez Ramos y Aidanet Carr Pérez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

RESUMEN

Se realizó una prospección de hongos entomopatógenos a partir de especies de insectos plaga sospechosos de micosis en cultivos de gran importancia económica y de muestras de suelo. De un total de 53 muestras se obtuvieron 17 útiles que correspondieron a 15 aislados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., una de *Paecilomyces lilacinus* Samson y una de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. El predominio de aislados de *Beauveria* fue consecuencia en parte del amplio rango de hospedantes de esta especie fúngica y a la cantidad de muestras procesadas que pertenecieron a *Hypothenemus hampei* (broca del café), donde este microorganismo es un patógeno muy habitual. Solamente se obtuvo un aislado de hongo de las 15 muestras de suelo procesadas mediante el trapeo con insectos patrones. Todos los aislados se incorporaron a la Colección de Cepas de Hongos Entomopatógenos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), donde se registraron sus características macroculturales, microculturales, origen y especie a que pertenecen, con el objetivo de conservarlos para futuros estudios como agentes potenciales de biocontrol de insectos plaga.

Palabras claves: hongos entomopatógenos, hongos mitospóricos, control biológico, plagas

ABSTRACT

A screening for entomopathogenic fungi from both mycosis suspect insect cadavers in crops of economical importance and soil samples was carried out. Of a total out of 53 samples collected 17 resulted successful which belonged to 15 isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., one of *Paecilomyces lilacinus* Samson and one of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. The predominance of *Beauveria* isolates was a consequence in part of the large amount of samples taken from *Hypothenemus hampei* (coffee berry borer) where this microorganism has been found as a very common pathogen as well as the broad host range this fungal species exhibits in nature. Only one fungal isolate of fifteen different soil samples tested by insect bait method was obtained. All the isolates recovered were stored in the Plant Health Research Institute (INISAV) Culture Collection being previously recorded in a datasheet with the micro and macro cultural characteristics, origin and species name, for further research for a potential use as biological control agents of insect pests.

Key words: entomopathogenic fungi, mitosporic fungi, biological control, pests

INTRODUCCIÓN

Los hongos mitospóricos están catalogados como un grupo mundialmente reconocido de agentes microbianos a usarse tanto en los programas de control biológico de plagas como en los de manejo integrado de plagas (MIP). Esto es debido a su forma de actuar, que es por contacto directo con la cutícula del hospedero y por la disponibilidad de tecnologías para producirlos masivamente. Algunos géneros además se pueden formular en aceites y así aplicarse con técnicas de volumen ultrabajo [Bateman *et al.*, 1993; Bateman *et al.*, 1996].

Está demostrado que para llegar a obtener un producto altamente efectivo para controlar una especie plaga se debe partir de un amplio rango de aislados, seleccio-

nados en principio en cuanto a su virulencia. Los aislados que causan epizootias espectaculares, como es el caso de algunos de los géneros fúngicos imperfectos entomopatógenos, son candidatos promisorios para usarse en el control de plagas, siempre y cuando logren clasificar sobre la base de otras características esenciales como son un nivel de especificidad de hospedante estrecho, buena tolerancia a factores ambientales adversos, facilidad de producción, comportamiento en almacenaje adecuado y alta seguridad en mamíferos [Bateman *et al.*, 1996].

Clásicamente hay tres vías de enriquecer el número de aislados fúngicos para utilizarse como candidatos en el

control biológico de plagas. La primera es mediante el aislamiento del hongo a partir de artrópodos y nematodos micosados, la segunda a través de muestras de suelo y por último directamente de las colecciones de cultivo [Rhodes y Smith, 1992].

Una vez aislado el agente es necesaria una correcta identificación. La identificación tradicional por medio de las características morfológicas mantiene un peso relevante, aunque se han introducido conceptos nuevos que conllevan a algún tipo de marcador molecular que permita, entre otras cosas, identificar al agente incluso después de su liberación [Bridge y Arora, 1998 citados por Bieliková *et al.*, 2002].

En Cuba, dentro de los hongos entomopatógenos están autorizados a producirse masivamente solamente dos cepas de *Beauveria bassiana* de las que una no es nativa, y la otra es de *Metarhizium anisopliae*. Para el caso de *Lecanicillium lecanii* (syn. *Verticillium lecanii*) se cuenta con dos cepas en la producción, ambas foráneas. Por estas razones surge la necesidad de contar con mayor cantidad de aislados e introducir nuevos en la producción, que tengan ventajas como controladores de determinadas plagas agrícolas con respecto a las que ya se producen masivamente en el país.

Los objetivos del trabajo fueron realizar aislamientos de hongos patógenos a artrópodos (insectos), con énfasis en especies plaga de relevancia económica, identificarlos taxonómicamente e incorporarlos a la Colección de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) para estudios posteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los Laboratorios Provinciales de Sanidad Vegetal (LAPROSAV) y en el INISAV se recibieron muestras que consistieron en individuos muertos pertenecientes a la clase Insecta, sospechosos de micosis, según síntomas de momificación y/o mecanización, o con esporulación de naturaleza fúngica en la superficie cuticular; también se recibieron muestras de suelo. Ambas muestras procedían de zonas donde se habían observado epizootias y no aplicado productos a base de hongos entomopatógenos, de acuerdo con registros históricos de campo.

Para el aislamiento del hongo, que ya estaba esporulado sobre los individuos colectados, se realizaron siembras en placas Petri de 9 cm de diámetro, por agotamiento en agar sabouraud dextrosa o agar papa dextrosa (PDA) o agar extracto de malta (MEA), en presencia de antibióticos, según el método descrito por Rhodes y

Smith (1992). Para los individuos sospechosos de micosis se realizaron lavados con agua estéril y desinfecciones con NaHClO a 0,5% durante 1 min. Seguidamente se realizaron dos lavados por agua estéril y se colocaron en cámaras húmedas incubadas a 28°C por 7-9 días. A partir del segundo día se observaron, y en los individuos donde se detectó emergencia de micelio se realizaron transferencias bajo condiciones asépticas, con siembras por agotamiento de acuerdo con el método ya mencionado.

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos con *Galleria mellonella* se siguió el método de trampeo descrito por Zimmermann en 1986 [citado por Sun, 2002] con algunas modificaciones para este trabajo. Las muestras de suelo se obtuvieron a partir de la selección de una hectárea que fuese representativa de un agroecosistema con registros de infecciones por hongos entomopatógenos en insectos plaga. Se tomaron cinco puntos al azar y de cada punto se colectaron 10 submuestras de 10 cm³ de suelo cada una. El material se colocó en bolsas oscuras y se homogenizaron en una muestra única en el laboratorio. Se vertieron 6-10 g de suelo por placa Petri de 12 cm de diámetro y en cada una se colocó un individuo de *Galleria mellonella* o *Corcyra cephalonica* de primeros estadios larvales, como insectos cebo o trampeadores. Las placas se observaron a partir del segundo día hasta el noveno, con movimiento diario. Si en este intervalo ocurría la muerte se procedía a la desinfección superficial, incubación y aislamiento del supuesto hongo de forma similar a lo explicado en el párrafo anterior para los individuos sospechosos de micosis.

Las colonias obtenidas en placa se observaron al microscopio estereoscópico y se realizaron preparaciones al microscopio óptico que se compararon con las descripciones de géneros hifomicetos de Carmichael *et al.* (1980) y Barnett y Hunter (1998). En caso de pertenecer el individuo a un género patogénico de interés, se realizaba un subcultivo en medio agarizado y se registraba como un nuevo aislado de la colección; en caso contrario las muestras procesadas se destruían. La identificación del patógeno a nivel de especie se realizó con ayuda de las descripciones de especies de hongos entomopatógenos del CMI, de acuerdo con las características macro y microculturales [CMI, 1979].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados de hongos entomopatógenos obtenidos correspondieron a los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium*, a los que se les estudiaron sus características macro y microculturales más notables (*Tabla 1*).

Tabla 1. Aislados de hongos entomopatógenos obtenidos. Principales características macro y microculturales

Aislado (número de registro de origen)	Origen	Identificación	Características macroculturales	Características microculturales
Bb-102	<i>Metamasius hemipterus ceriseus</i> (coleóptero), Matanzas	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias al inicio blancas afieltradas que con el tiempo se tornan crema polvorientas. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2,0-3,0 (2,3 µm) x 2,0-2,5 (2,1 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,0-2,5 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-103	<i>Metamasius hemipterus</i> (coleóptero), Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias algodonosas y blancas al inicio que se tornan crema y polvorientas con el tiempo. Reverso amarillo ligero	Muy abundantes conidioforos con grupos densos de células filalídicas. Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 1,5-3,0 (2,7 µm) x 2,0-3,0 (2,2 µm). Conidios hialinos, a veces con un ápice muy definido, globosos a elipsoidales 1,5-3,0 (2,3 µm) x 1,5-3,0 (2,1 µm)
Bb-105	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), cafetal, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y ligeramente polvorientas, según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2,0-3,0 (2,3 µm) x 2,0-2,5 (2,2 µm). Conidios muy homogéneos, hialinos, globosos, algunos subglobosos, 2,0-2,0 µm
Bb-106	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan crema claro y ligeramente polvorientas según esporulan con el tiempo. Algunos coremios. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 2,0-3,5 (2,3 µm) x 1,0-2,5 (1,9 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,5-2,0 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-107	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y ligeramente polvorientas según esporulan con el tiempo. Algunos coremios Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 2,0-3,5 (2,3 µm) x 1,0-2,5 (1,9 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,5-2,0 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-SP	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lepidóptero), maíz, Camagüey	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias algodonosas y blancas al inicio que se tornan beis y ligeramente polvorientas con el tiempo. Reverso miel	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas, 2,0-3,0 (2,4 µm) x 2,0-2,5 (2,3 µm). Conidios muy homogéneos, hialinos, globosos, algunos ligeramente subglobosos, 2,0-2,0 µm

Bb-200603	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Holguín	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo claro	Células conidiógenas, predominan las de forma de botella, 3,0-4,0 (3,3 μm) x 3,0-2,0 (2,3 μm). Conidios variables, aunque predominan formas elipsoidales, base apiculada en ocasiones, hialinos, 2,0-3,0 (2,3 μm) x 2,0-3,0 (2,3 μm)
Bb-cepa2	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo pálido	Células conidiógenas típicas de la especie, con bases globosas, 2,0-3,0 (2,2 μm) x 2,0-2,5 (2,3 μm). Conidios globosos a subglobosos, hialinos, algunos apiculados, 2,0-2,5 (2,2 μm) x 1,5-2,0 (1,8 μm)
Bb-cepa3	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo muy pálido	Células conidiógenas típicas de la especie, con bases globosas, 2,0-3,0 (2,3 μm) x 2,0-2,5 (2,4 μm). Conidios subglobosos a ligeramente elipsoidales, predominando estos últimos, hialinos, 2,0-3,0 (2,6 μm) x 2,0
Bb-cepa4	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo pálido	Células conidiógenas predominan las de forma de botella, 3,0-4,0 (3,2) x 3,0-2,0 (2,4 μm). Conidios, predominan formas elipsoidales, algunos globosos a subglobosos, hialinos, en ocasiones apiculados, 2,0-3,0 (2,5 μm) x 2,0-2,5 (2,2 μm)
Bb-cepa5	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y polvorientas según esporulan con el tiempo. Tendencia discreta a formar coremios. Reverso amarillo miel	Células conidiógenas, predominan las de forma de botella, 3,0-4,0 (3,3) x 3,0-2,0 (2,5 μm). Conidios, predominan formas elipsoidales con ápice definido, algunos subglobosos, hialinos, 2,0-3,0 (2,6 μm) x 2,0
Bb-1234	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, Guamá, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis medio y polvorientas según esporulan con el tiempo. Tendencia a formar coremios. Reverso amarillo	Células conidiógenas típicas de la especie, con bases globosas, 2,0-3,0 (2,3 μm) x 2,0-2,5 (2,4 μm). Conidios globosos a subglobosos ligeramente, hialinos, 2,0 x 2,0 μm
Bb-SIM	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, Tercer Frente, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis pálido y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo pálido	Células conidiógenas con bases globosas, 2,0-3,0 (2,1 μm) x 2,0-2,5 (2,4 μm). Conidios subglobosos a ligeramente elípticos, hialinos, 2,0-3,0 (2,3) x 1,5-2,5 (2,1) μm

Bb-SL	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, San Luis, Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en MEA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis pálido y ligeramente polvorientas según esporulan con el tiempo. Tendencia a formar coremios. Reverso amarillo pálido	Células conidiógenas predominan las de forma de botella 3,0-4,0(3,3) x 3,0-2,0 (2,7 µm). Conidios subglobosos a ligeramente elípticos y hasta elipsoidales, hialinos, 2,0-3,0 (2,3) x 2,0 µm
Bb-Inv	<i>Cylas formicarius</i> (coleóptero), boniato, Camagüey	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis pálido y ligeramente costrosas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo pálido	Células conidiógenas predominan las de forma de botella, 3,0-4,0 (3,4) x 3,0-2,0 (2,8 µm). Conidios ligeramente elípticos hasta elipsoidales, ápice discreto, hialinos, 2,0-3,0 (2,5) x 1,0-2,0 (1,6) µm
Bb-1212	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, Los Llanos, Guisa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis y polvorientas según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo	Células conidiógenas con bases globosas, 2,0-3,0 (2,2 µm) x 2,0-2,5 (2,3 µm). Conidios globosos a subglobosos, hialinos, 1,5-2,0 (1,8) x 2,0 µm
PI-01M2	<i>Hypothenemus hampei</i> , café, Santiago de Cuba	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Colonias en PDA al inicio blanco lanoso que se tornan violeta grisácea con la edad y con micelio aéreo irregular. Reverso vináceo	Conidioforos solos o en grupos, forman sinemas con verticilos de hasta seis fiálides, con la edad se tornan rugosos. Células conidiógenas típicas, 7,0-13,0 (9,5 µm) x 1,5-3,0 (2,8 µm). Conidios catenulados, gris-violeta claro, elipsoidales a fusiformes, algunos con un ápice, 1,5-3,0 (2,2 µm) x 1,5-3,0 (2,4 µm)
Ma-30	Muestra de suelo (insecto trampa <i>Galleria mellonella</i>), IPA Villena, La Habana	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Colonias en PDA blancas y algodonosas al inicio que se tornan amarillo verdoso y finalmente verde olivo oscuro y costroso con zonas con micelio aéreo abundante blanquecino. Reverso amarillo intenso	Patrón conidioforo típico de la especie con verticilos de 2-3 ramas cada uno, con tonos verde olivo oscuro que aclara al ápice. Células conidiógenas 6,0-10,0 (8,1 µm) x 2,0-2,5 (2,1 µm). Conidios subhialinos a ligeramente verdes, cilíndricos a ligeramente elipsoidales, 5,0-8,5 (6,6 µm) x 2,0-3,0 (2,4 µm)

De un total de 53 muestras procesadas de las que 15 fueron de suelo de zonas donde se habían observado epizootias, 17 resultaron muestras exitosas. De los aislados obtenidos solamente uno correspondió a una muestra de suelo, que fue obtenido por trampeo con larvas de *Galleria mellonella* (Fig. 1).

Con respecto a las especies de interés detectadas se puede observar que hubo una predominancia de aislados pertenecientes a la especie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Tabla 1, Fig. 2).

En contraste, solo se obtuvo un aislado de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y otro de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson (Fig. 1).

Este comportamiento se puede atribuir a la efectividad del método de trampeo con insectos susceptibles, donde se requiere de una cantidad de propágulos viables que garantice la infección, los que deben ser del orden de 10^4 unidades por insecto como mínimo según Bateman *et al.* (1996) y Moore y Caudwell (1997). Se sabe que el establecimiento de poblaciones de hongos

entomopatógenos en el suelo está determinado tanto por las propiedades físicas y químicas de cada suelo como por las de la cepa fúngica en cuestión [Rhodes y Smith, 1992]. También existe la posibilidad de que los microorganismos competidores con su producción de

metabolitos activos afecten la viabilidad de estos propágulos fúngicos deseados [Jenkins y Grzywacz, 2000]. Por ello, el trapeo puede fallar si no existe una concentración alta de esporas viables del microorganismo de interés en el suelo



Figura 1. Larva momificada de *Galleria mellonella* en cámara húmeda infectado con el aislado Ma-30 de *Metarhizium anisopliae* a partir de muestra de suelo. Nótese la emersión temprana del micelio en blanco.

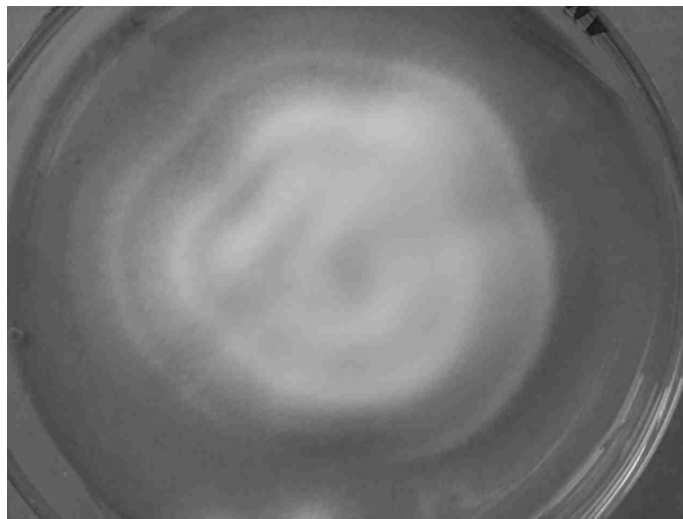


Figura 2. Colonia de *Beauveria bassiana* aislado Bb-105 obtenido de *Hypothenemus hampei*.

Sun (2002) logró 6,7% de éxito para *Metarhizium* y 10% de éxito para *Beauveria* en trapeos con el termite *Coptotermes formosanus*, a partir de 90 muestras originales de suelo, porcentajes superiores de éxito con respecto al procesamiento de termitas sospechosas de micosis; sin embargo, Zimmermann (1986) [citado por Sun, 2002] se refiere al método de trapeo con

Galleria como uno de los más exitosos para detectar entomopatógenos en termitas.

Por otro lado, Dhoj *et al.* (2006) recomiendan también el método de trapeo con *Galleria* en contacto con muestras de suelo, porque fundamentalmente es el que lleva poca especialización y el tiempo del ensayo es corto con un porcentaje de éxito alrededor de 75% para

aislar *Beauveria* y *Metarhizium*. Estos mismos autores usaron 15 g de suelo aproximadamente por cada individuo de *Galleria* y pusieron en contacto con el suelo al insecto trampeador hasta 18 días; sin embargo, en este trabajo se obtuvo una sola muestra de suelo útil por trapeo con *Galleria*, lo que representó 7% de éxito. Este comportamiento puede deberse a que la cantidad de suelo por individuo fue de 6-10 g, y el tiempo en contacto con este solo fue de nueve días, además de que la cantidad de propágulos del hongo de interés presente en el suelo es muy variable y depende de condiciones específicas de cada ecosistema (*Tabla 1 y Fig. 1*).

Un método más efectivo para obtener nuevos aislados de hongos es el aislamiento de colonias fúngicas únicas (ufc) a partir de muestras de suelo por diluciones seriadas, según procedimiento detallado por Lecuona (1996). No obstante, es ampliamente aceptado que este método es muy caro y se prefiere usar en el aislamiento y selección de especies bacterianas, como por ejemplo *Bacillus thuringiensis* [Johnson y Bishop, 1996], de ahí que se decidiera no emplearlo para enriquecer el número de aislados de la Colección de Hongos Entomopatógenos del INISAV.

El porcentaje de éxito obtenido en este trabajo para las muestras de insectos sospechosos de micosis o con una evidente fue de 42%. Jackson *et al.* (2000) plantean que aunque este método de aislamiento directo conlleva mucho tiempo de muestreo en campo y experiencia, la realidad es que entre los más exitosos agentes de control con microorganismos se encuentran aquellos aislados obtenidos directamente de los insectos hospederos, y no de las colecciones de cultivos o de métodos indirectos a través de medios de cultivo selectivos.

La frecuencia alta de aparición de *Beauveria bassiana* se debió al amplio rango de hospedantes de este patógeno, además de que la mayoría de los aislamientos se hicieron a partir de *Hypothenemus hampei* (broca del café), y se conoce que esta especie fúngica regularmente se ha encontrado que atacan las poblaciones del insecto de forma natural en los cafetales. De hecho, es esta la razón de que sea uno de los entomopatógenos más estudiados para el control de esta plaga [Bustillo *et al.*, 1999].

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. así como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. y *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal están entre los hongos entomopatógenos más usualmente encontrados en la natura-

leza. Por ello, colecciones de cultivo internacionalmente reconocidas cuentan con varios cientos de aislados de estas tres especies como la Colección de Hongos Entomopatógenos para Investigaciones Agrícolas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (ARCEF), la ATCC (American Type Culture Collection) y la Colección del IMI (International Mycological Institute) en el Reino Unido [Humber, 1992; Bateman *et al.*, 1996]. En Cuba más del 85% de la Colección de Hongos Entomopatógenos del INISAV está representada por aislados de *Beauveria* y *Metarhizium*.

En relación con el aislamiento de *Paecilomyces lilacinus* obtenido de *Hypothenemus hampei* se sabe que este hongo se encuentra comúnmente en las crías de broca en laboratorio, donde es posible que las condiciones de hacinamiento, la alta humedad relativa y la falta de desinfección de las cerezas favorezcan la invasión de esta especie para atacar a la broca, si bien en la planta de café en el campo no se ha encontrado [Posada *et al.*, 1998]. También es cierto que *P. lilacinus* está catalogado como hongo entomopatógeno oportunista y se ha usado exitosamente en el control de nematodos fitopatógenos [López, 1995]. Por esta razón se decidió incorporarlo a la Colección de Hongos Entomopatógenos del INISAV para futuras investigaciones.

Los productos exitosos a base de hongos desarrollados en el mercado han surgido a partir de un monitoreo de aislados obtenidos de las regiones geográficas y agroecosistemas, donde está el organismo plaga por controlar, así como de las colecciones de cultivos. Bateman *et al.* (1996) reportaron la selección de una sola cepa de *M. anisopliae*, después de haber ensayado 159 aislados de *Beauveria* y *Metarhizium* contra *Schistocerca gregaria* (langosta del desierto). Esto confirma la necesidad de contar con abundante cantidad de aislados de los más diversos orígenes cuando se precisa obtener agentes microbianos efectivos como biocontroladores de plagas [Bateman *et al.*, 1996; Jenkins y Grzywacz, 2003].

Como se puede apreciar, de acuerdo con las características macro y microculturales, para los aislados de *Beauveria* existió una alta similitud, por lo que una separación entre estos por los métodos tradicionales morfométricos no es factible (*Tabla 1*). Para lograr la distinción entre aislados hay que recurrir a métodos de biología molecular como RFLP y PCR-RAPDS [Bridge *et al.*, 1993; Bridge y Arora, 1998; Bielikova *et al.*, 2002]. Estos métodos moleculares también se usan como una forma altamente reproducible de reconocer cada

aislado para patentar, registrar los productos y monitorear tanto su destino en el ecosistema donde se libere como las posibles interacciones negativas que puedan existir entre el aislado liberado y el resto de los aislados de la misma especie [Jenkins y Grzywacz, 2000; Bielikova *et al.*, 2002].

Finalmente todos los aislados de interés obtenidos se incorporaron al banco de cepas de hongos entomopatógenos, y en la base de datos de esa colección se registraron las características macroculturales, microculturales, origen y especie a que pertenecen, con el objetivo de conservarlos como agentes potenciales de biocontrol de insectos plaga para futuros estudios.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 17 nuevos aislados de hongos entomopatógenos de los que uno fue de *Metarhizium anisopliae*, uno de *Paecilomyces lilacinus* y el resto de *Beauveria bassiana*.
- El método de aislamiento directo a partir de insectos micosados tuvo 42% de efectividad.
- El método de aislamiento a partir de muestras de suelo de hongos entomopatógenos mediante trapeo con larvas de *Galleria* y *Corcyra* fue muy inefectivo, con 7% de éxito solamente.

REFERENCIAS

Barnett, H. L.; B. B. Hunter: *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th Edition, The American Phytopathological Society Press, 1998.

Bateman, R.; M. Carey; D. Moore; C. Prior: «The Enhanced Infectivity of *Metarhizium flavoviride* in Oil Formulations to Desert Locusts at Low Humidities», *Annals of Applied Biology* 122:145-52, 1993.

Bateman, R.; M. Carey; D. Batt; C. Prior; Y. Abraham; D. Moore; N. E. Jenkins; J. Fenlon: «Screening for Virulent Isolates of Entomopathogenic Fungi Against the Dessert Locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.)», *Biocontrol Science and Technology* 6:549-60, 1996.

Bieliková, L.; Z. Landa; L. S. Osborne; V. Ěurn: «Characterization and Identification of Entomopathogenic and Mycoparasitic Fungi Using RAPD-PCR Technique», *Plant Protection Science* 38 (1):1-12, 2002.

Bridge, P. D.; M. A. J. Williams; C. Prior; R. R. M. Paterson: «Morphological, Biochemical, and Molecular Characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*», *J. Gen. Microbiol.* 139:1163-1169, 1993.

Bridge, P. D.; D. K. Arora: «PCR for Species Definition», *Applications of PCR in Mycology*, CAB International, Wallingford, 1998, pp. 63-84.

Bustillo, A.; M. Bernal; P. Benavides; B. Chaves: «Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) Population Emerging from Fallen Coffee Berries», *Fla. Entomol.* 82:491-498, 1999.

Carmichael, J. W.; W. B. Kendrick; I. L. Connors; L. Sigler: *Genera of Hyphomycetes*, Univ. Alberta Press, Edmonton, Canada, 1980.

CMI: *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. The Cambrian News*, Commonwealth Agricultural Bureaux, Surrey, Inglaterra, 1979.

Dhoj, Y.; S. Keller; P. Nagel: «Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi to White Grubs of Maize Based Cropping System in Nepal. Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, June 2006, http://www.umad.de/infos/cleanair13/pdf/full_348.pdf.

Humber, R. A.: «Collection of Entomopathogenic Fungi Cultures, Catalogue of Strains 1992», USDA Agricultural Research Service ARS-110, Plant Protection Research Unit, Ithaca, New York, 1992.

Jackson, T. A.; S. B. Alves; R. M. Pereira: «Success in Biological Control of Soil-Dwelling Insects by Pathogens and Nematodes», *Biological Control: Measures of Success*, Kluwer Academic Public Publishers, Boston, EE.UU., 2000, pp. 271-296.

Jenkins, N. E.; D. Grzywacz: «Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents-Assurance of Product Performance», *Biocontrol Science and Technology* 10:753-777, 2000.

—: «Towards the Standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents», *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*, CAB International, 2003.

Johnson, C.; A. H. Bishop: «A Technique for the Effective Enrichment and Isolation of *Bacillus thuringiensis*», *FEMS Microbiology Letters* 142:173-177, 1996.

Lecuona, R.: Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga, Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, 1996.

López, Miriam: «*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: caracterización, reproducción y obtención de un biopreparado con efecto nematocida». Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, INISAV, La Habana, 1995.

Moore, D.; R. W. Caudwell: «Formulation of Entomopathogens for the Control of Grasshoppers and Locusts», *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171:49-67, 1997.

Posada, F. F.; M. P. Marín; S. M. Pérez: «*Paecilomyces lilacinus*, enemigo natural de adultos de *Hypothenemus hampei*», *Cenicafé* (Columbia): 49(1):72-77, 1998.

Rhodes, D. J.; J. D. Smith: «Techniques for Quantifying the Ecological and Pathological Characteristics of Entomopathogenic Fungal Strains». Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 351-356, 1992.

Sun, Jianzhong: «Screening and Characterization of Pathogenic Fungi for Possible Control of *Coptotermes formosanus*». A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Entomology, May, 2002, http://etd.lsu.edu/docs/submitted/etd-0415102-230223/unrestricted/Sun_dis.pdf