

**Caracterización patogénica, cultural y bioquímica de aislamientos de *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin.**

**Pathogenic, cultural and biochemical characterization of *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin's isolations.**

**Autores:** Alberto Fernández-Turro<sup>1</sup>, Belkis Peteira-Delgado<sup>2</sup>, Francisco A. Simón-Ricardo<sup>3</sup>, Éverton Kort Kamp-Fernandes<sup>4</sup>, Pedro Pozos-Ponce<sup>5</sup>.

**Organismo:** Universidad Guantánamo, Cuba<sup>1</sup>. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Mayabeque, Cuba<sup>2</sup>. Universidad Oriente, Santiago de Cuba<sup>3</sup>. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Setor, Universitário, Goiânia<sup>4</sup>. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México<sup>5</sup>. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México<sup>6</sup>.

**E-mail:** [afturro@cug.co.cu](mailto:afturro@cug.co.cu), [bpeteira@censa.edu.cu](mailto:bpeteira@censa.edu.cu), [evertonkort@yahoo.com.br](mailto:evertonkort@yahoo.com.br)

**Telef.** +55 (62) 3209-6154

**Fax:** +55 (62) 3209-6363

**Resumen.**

Se procedió a la caracterización cultural y bioquímica de nueve aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a partir de adultos de *Hypothenemus hampei* Ferrari de tres regiones cafetaleras de las provincias Guantánamo, Santiago de Cuba y Holguín, además de la cepa nacional (LBB-1) desarrollado en dos experimentos: en el primero se evaluó el diámetro de las colonias, la esporulación, la germinación en tres transferencias, la patogenicidad y la variable morfológica talla de los conidios, en el segundo experimento se realizó la caracterización bioquímica de seis de los aislamientos seleccionados mediante un estudio de inducción enzimática. Se encontró la existencia de una diferenciación en el agrupamiento entre aislamientos, con la formación de subgrupos con características similares, evidenciando la posibilidad de estos procedimientos para ser utilizado como herramienta en la selección de cepas promisorias para el biocontrol de insectos en especial la broca del café.

**Palabras clave:** *Beauveria Bassiana*; *Hypothenemus Hampei*; patogenicidad; actividad enzimática.

**Introducción.**

**Abstract.**

In this research was made the cultural and biochemical characterization of nine isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin from adults *Hypothenemus hampei* Ferrari from three coffee regions of special importance of the Guantánamo, Santiago de Cuba and Holguín provinces in addition to national strain (LBB-1) conducted in two experiments: In the first was evaluated the diameter of the colonies, sporulation, germination in three transfers, the pathogenicity and variable conidia-size morphological. The second experiment carried the biochemical characterization of six isolates through a dynamic study of enzyme induction. The existence of a differentiation in the grouping found among isolates, with the formation of subgroups with similar characteristics, demonstrating the ability of these procedures to be used as a tool in the selection of promising strains for biocontrol insects especially coffee berry borer.

**Keywords:** *Beauveria Bassiana*; *Hypothenemus Hampei*; pathogenicity; enzymatic activity.

El hongo Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin es uno de los agentes de control biológico que más se utiliza en el control de plagas y en especial de la broca de café como una alternativa compatible con el medio ambiente, que permite en gran medida la disminución del uso del control químico, Huang y Feng, (2009), Peteira et al., (2011), Cradock and Needham, (2011); Benavides et al., (2015). Varios son los registros científicos actuales que demuestran la existencia en muchas regiones del mundo una variabilidad genética de este entomopatógeno, sujeta de manera especial al factor localidad y no al tipo de hospedante; además de presentar en muchos casos diferencias en su patogenicidad sobre la broca del café y otras plagas. De igual manera en ensayos recientes bajo condiciones de laboratorio con mezclas de cepas de B. bassiana, se han logrado altos porcentajes de mortalidad de adultos de H. hampei.

Además del B. bassiana existen otros enemigos naturales como los nemátodos que se registran como alternativa de biocontrol de la broca del café y de otras plagas que afectan a este cultivo o al sistema de cultivos que en muchos de los casos es establecido dentro de este tipo de agroecosistema. En Cuba se realiza un gran esfuerzo en potenciar el uso de este entomopatógeno sobre la base de la utilización de cepas autóctonas que brinden un nivel de control aceptable en campo, que integradas con diferentes prácticas agronómicas y otros organismos promisorios de más reciente introducción en el país, se mejoren las estrategias de manejo del actual complejo nocivo del café, Sánchez y Rodríguez, (2008), Fernández et al., (2013). Una de estas estrategias para lograr tales propósitos, es la caracterización de cepas promisorias con la finalidad de la optimización de la producción, formulación, identidad, capacidad de biocontrol y tolerancia a condiciones de estrés, este último profundamente analizado por Senthilrajaa et al., (2010), Shang et al., (2012), Yew et al., (2013), Fernandes et al. (2015) Chandler et al., (2011). De ahí, que el objetivo de este trabajo fue la caracterización patogénica, cultural y bioquímica de aislamientos de B. bassiana obtenidos de adultos de H. hampei micosados de diferentes regiones cafetaleras del oriente de Cuba.

## **Desarrollo.**

### **Materiales y Métodos**

#### Esquema general de trabajo

Como parte de la continuación del proyecto territorial Contribución al manejo integrado de broca del café en las provincias orientales de Cuba, se desarrolló un nuevo proyecto con financiamiento del Ministerio de Educación Superior (MES), donde se procedió a la caracterización cultural y bioquímica de 9 cepas autóctonas del hongo B. bassiana aisladas de adultos de broca micosados por este entomopatógeno, las cuales procedían de regiones cafetaleras de mucha importancia para las provincias de Guantánamo (Cepa 1 Cod:3067; Cepa 3: Cod:3079; Cepa 5 Cod:3081; Cepa 9 Cod:3085; Cepa 14 Cod:3089; Cepa 15 Cod:3090); Santiago de Cuba (Cepa 23 Cod:3053) y una cepa de la región de la Alcarraza provincia Holguín (Cepa 7 Cod:3083) y la Cepa 33 (Cepa Nacional Cod:LBB-1). El trabajo se desarrolló en dos experimentos, el primero con el objetivo de realizar la caracterización cultural de los aislamientos, donde se evaluaron las variables diámetro de las colonias en los medios de cultivos PDA y Agar Sabouraud Dextrosa SDA, la esporulación y la germinación la cual se realizó sobre el medio PDA en tres transferencias y finalmente la patogenicidad sobre los adultos de broca para la evaluación de la variable morfológica talla de los conidios, se utilizó un micrómetro adaptado al microscopio usando un objeto 40 y coeficiente  $X=0.239$ . Para poder determinar la posible diferenciación de los

aislamientos a partir de estas variables evaluadas y a su vez facilitar la caracterización bioquímica, se realizó un análisis multivariado de tipo Cluster que permitió la selección de cepas. En el segundo experimento, se procedió a la caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas a través de un estudio de dinámica de inducción en diferentes medios de cultivo. Para ello se sembraron discos de micelio de seis cepas en medio basal como control, medio basal suplementado con gelatina y medio basal suplementado con quitina, con la determinación de proteínas totales, actividad quitinasa y actividad glucanasa, a los 3, 5 y 7 días postinoculación, además de la evaluación del crecimiento de las colonias en cinco medios basales sólidos. Finalmente se hizo otro análisis multivariado Cluster que permitió separar los grupos de aislamientos con características similares.

### **Experimento 1. Caracterización patogénica y cultural de aislamientos autóctonos de *B.bassiana***

#### **Patogenicidad de las cepas sobre adultos de *H. hampei***

Para la determinación de la patogenicidad se siguió la metodología descrita por Rodríguez y Góngora, (2005), con utilización de nueve cepas de primer pase sobre adultos de broca y cultivados posteriormente en un medio de cultivo SDA. Los parámetros de calidad como la pureza, viabilidad y titulación se realizaron de acuerdo a lo planteado por Elósegui (2003), considerando solo para el análisis estadístico las muertes de insectos adultos en el que se evidenció finalmente la presencia de la micosis del hongo. El diseño se conformó en cuatro repeticiones por aislamiento con 15 insectos adultos, cada una en viales independientes, los que contenían café pergamino molido en cámara húmeda hasta los 10 días posteriores a la inoculación con el hongo. El momento para la determinación de la patogenicidad fue a las 72 horas postinoculación, confirmándose la micosis de este entomopatógeno en nuevo reaislamiento a las 125 horas, el cual se desarrolló en el mismo medio de cultivo inicial.

#### **Caracterización cultural de los aislamientos**

Los dos medios de cultivo se esterilizaron a 121°C en autoclave por 15 minutos y previamente la acidez fue ajustada a un pH=5,6 la cual se realizó a partir de las indicaciones de Elósegui et al., (2003).

Determinación del crecimiento de las colonias en los medios de cultivos PDA y Agar Sabouraud Dextrosa SDA: el crecimiento de las colonias se determinó colocando un disco de 5mm del hongo de primera transferencia sobre el centro de placa con el medio de cultivo, que se incubó a 27±1°C en la oscuridad. Las mediciones del radio de las colonias se efectuaron a los 5, 10 y 15 después de la siembra de los discos replicados tres veces por aislamiento en cada una de las transferencias.

Determinación de la esporulación de las cepas en arroz provenientes Agar Sabouraud Dextrosa SDA: Para cuantificar la esporulación de las cepas se sembraron en tubos y se obtuvieron los cultivos de 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> transferencia, que se incubaron a 27±1°C en la oscuridad durante 15 días, posterior a esto se suspendió el cultivo de cada tubo en agua con Tween 80 al 0.01% agitándose por 10 minutos; se realizaron diluciones decimales y se procedió al conteo en la cámara de Neubauer. La determinación de la titulación en condiciones de producción se efectuó a través del depósito de 100 g de cabecilla de arroz en frascos de cristal de 500mL, los cuales fueron

esterilizados. Se prepararon inóculos con una suspensión de conidios a  $1 \times 10^7$  conidios.mL con Tween 80 al 0.01% y se depositaron 40 mL de inóculo de 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> transferencia replicados tres veces. Los frascos se incubaron en un medio climatizado ( $23-27 \pm 0^\circ\text{C}$ ) por 15 días; transcurrido ese tiempo se extrajo 1g de cultivo sobre arroz por frasco y se realizaron las diluciones decimales en agua destilada más Tween 80 al 0.01% para el conteo de los conidios.

Para evaluar la conservación del cultivo se tomaron 3 tubos de cada transferencia por cepas y se incubaron a  $9^\circ\text{C}$ . Transcurrido un tiempo de cuatro meses y 15 días (135 días), de tres meses y 21 días (111 días) y tres meses (90 días) para los cultivos según transferencias (1, 2 y 3) para lo cual se procedió a realizar la prueba de germinación. Para esto se tomó con una asa mediante el raspado conidios de los cultivos y se suspendieron el agua estéril con Tween 80 al 0.01%. De cada suspensión se sembró 0,1mL en PDA sobre porta objeto en cámara húmeda, que se incubó a temperatura ambiente ( $24-30^\circ\text{C}$ ) y se determinó el porcentaje de germinación a las 24 horas. Se contaron por cada cuadrante el número de conidios germinados, los cuales fueron los que tuvieron presente el tubo germinativo en proporción a 100 conidios observados.

Talla de los conidios: esta variable se determinó con la utilización de portaobjetos, sobre los cuales se depositaron gotas de una suspensión de cada uno de los aislamientos de concentración conocida de esporas de  $1.3 \times 10^7$  conidios.mL<sup>-1</sup>. Con la utilización de un micrómetro adaptado al microscopio usando un objeto 40 y coeficiente  $X=0.2391$

## **Experimento 2. Caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas de *B. bassiana* a través de un estudio de dinámica de inducción.**

Evaluación del crecimiento de las colonias de *B. bassiana* en diferentes medios basales sólidos: se evaluaron 5 variantes de medios basales sólidos que conformaron los cinco tratamientos, cada caso replicado tres veces: T1(extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$ + quitina  $5\text{g.L}^{-1}$  + peptona  $4\text{g.L}^{-1}$ ; T2: medio basal (extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$ + peptona  $4\text{g.L}^{-1}$  control); T3: extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$ ; T4: extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$ + quitina  $5\text{g.L}^{-1}$ ; T5: extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$ + gelatina  $20\text{g.L}^{-1}$ ; después de la esterilización se vertieron en placas de petri 10mL del medio correspondiente para cada caso. De las cepas conservadas en medio Agar-Malta (Biocen) a  $4^\circ\text{C}$ , se cultivaron nuevamente en medio PDA (Biocen) en placas Petri de 9 cm que fueron incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por tres días, se extrajo el micelio en discos de 5mm que se sembraron en los diferentes medios cultivo y puestos a igual incubación. Las evaluaciones del crecimiento de las colonias se realizaron a las 24, 72, 125 y 168 horas después de la siembra, además de la descripción de las características del crecimiento de las colonias.

Estudio de la dinámica de inducción enzimática en medio líquido: en el presente trabajo se emplearon las mismas cepas de *B. bassiana* 3, 5, 9, 14, 23 y 33, procedentes del cepario del Laboratorio de Micología Vegetal de la Facultad Agroforestal de la Universidad de Guantánamo, seleccionados por poseer alta capacidad como agentes de control biológico de la broca del café *H. hampei* incluyendo la cepa 5 que aunque no tuvo un alto nivel de patogenicidad su aporte es como patrón adicional de comparación. Todas las cepas se conservaron en medio Agar-Malta (Biocen) a  $4^\circ\text{C}$  y para su uso se subcultivaron en medio PDA (Papa Dextrosa Agua, Biocen) en placas Petri de 9 cm contentivas PDA incubadas a  $28^\circ\text{C}$  durante 3 días, momento en que se tomó el micelio para el desarrollo del experimento de dinámica.

Para la inducción de proteínas en medio líquido se ensayaron tres variantes diferentes: a) medio basal líquido que contenía extracto de levadura  $1\text{g.L}^{-1}$  y peptona  $4\text{g.L}^{-1}$  (empleado como control), b) medio basal líquido suplementado con quitina ( $5\text{g.L}^{-1}$ ) y c) medio basal líquido suplementado con gelatina al 0,2% (p/v). Los dos primeros medios se esterilizaron a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 20 min, mientras que el medio que contenía gelatina se esterilizó a  $115^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. En todas las variantes, se dispensaron 20mL del medio en frascos estériles de 100mL, los cuales se inocularon con cuatro discos de micelio de 5mm de diámetro de la periferia de la colonia de cada cepa y posteriormente se incubaron estáticamente a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y los frascos se retiraron de la incubadora al tercer, quinto y séptimo días después de la inoculación y filtrando los sobrenadantes a través de papel de filtro Whatman 3 conservándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en los análisis enzimáticos.

Para la determinación de los contenidos de proteínas totales se siguió el protocolo descrito por Bradford, (1976), realizando las lecturas de la absorbancia a 595nm del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250, en un espectrofotómetro (Lasso Spec III, Lasso Biotech LTDA) y empleando para la curva patrón una solución de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  de albúmina de suero bovina (BSA).

La actividad quitinasa se determinó con 0,2 mL de quitina coloidal  $10\text{mg.mL}^{-1}$  preparada acorde a Boller et al. (1983) como sustrato y se mezcló con 0,5 mL de muestra sobrenadante. Para el resto de la determinación se siguió el protocolo descrito por González et al., (2010). La curva patrón se determinó utilizando N-acetil glucosamina, a partir de una solución madre de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  llevado a cabo con el mismo procedimiento que a las muestras. La lectura se realizó a 585 nm y el cálculo de la actividad enzimática se realizó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{DO \times \cot \times V_{\text{ens}} \times Dil}{T_{\text{incub}} \times V_{\text{enz}}}$$

Donde DO: densidad óptica; cot: cotangente del ángulo de la curva patrón; V<sub>ens</sub>: volumen de ensayo; Dil: dilución; T<sub>incub</sub>: tiempo de incubación y V<sub>enz</sub>: volumen de enzima. Las unidades de actividad fueron:  $\mu\text{moles de producto formado.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$  de enzima. Para la determinación de la actividad enzimática de las 1,3  $\beta$ -glucanasas se utilizó una variante en microplacas de 96 pozos desarrollada por (Zhengy and Wozniak, 1997).

La actividad específica para ambas enzimas se determinó según la expresión:

$$\text{Actividad específica} = \text{Actividad enzimática} / \text{concentración de proteínas (mg.mL}^{-1}\text{)}.$$

En todas las determinaciones se realizaron tres réplicas. Para simplificar el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó el Análisis Multivariado de Componentes Principales por el paquete estadístico InfoStat, (2009), el cual permitió además determinar el (los) medio(s) y el (los) día (días) que favorecieron la inducción de la actividad proteínas totales, quitinasas y glucanasas (por separado para cada, así como definir el (los) aislamiento(s) que presenta los mayores niveles de expresión de estas enzimas. La determinación de la influencia integral para cada experimento se realizó mediante un Análisis Multivariado de tipo Cluster y así definir los grupos de aislamiento de acuerdo a las características similares utilizando el paquete estadístico Stagraphics Centurion en ambiente Window 8.1.

## Resultados y discusión.

### Patogenicidad de los aislamientos sobre adultos de *H. hampei*

Los bioensayos de patogenicidad de los aislamientos de *B. bassiana* sobre la broca del café, mostraron variaciones significativas en su porcentaje de mortalidad de adultos; las cepas cinco y siete resultaron ser las menos eficientes en condiciones controladas, las cuales difieren entre sí; sin embargo, en las demás cepas los valores porcentuales estuvieron entre 85-98,3% de mortalidad (Tabla 1).

Así mismo, los aislamientos que mayor porcentaje de mortalidad expusieron fueron el autóctono (cepa 9) y la cepa de referencia nacional LBB-1(33); aunque, el aislamiento 23 de la provincia Santiago de Cuba no difiere en significación con relación a este último.

Es importante señalar, que la respuesta diferenciada en cuanto a porcentaje de mortalidad a las 72 horas observadas en esta investigación, puede considerarse un elemento clave a tener en cuenta en la evaluación de aislamientos de *B. bassiana* de origen local ; ya que, el proceso de desarrollo de la enfermedad que produce este entomopatógeno sobre la broca del café tiene dos fases fundamentales: la patogénica, que ocurre en las primeras 72 horas y es donde se produce la muerte de este curculiónido; en esta fase, juega un papel muy importante la actividad enzimática específica del hongo que se desencadena una vez que se inicia el proceso de penetración Zhanga et al., (2008); y la segunda fase (saprofítica) Ownley et al., (2008), concluye con aparición de un micelio algodonoso que cubre todo el insecto alrededor del quinto día, pudiendo existir en la plantas como endófito; todo esto, muy relacionado con las condiciones ambientales en el que se desarrolle la enfermedad, Ownley et al., (2010).

**Tabla 1.** Comportamiento de la patogenicidad de las cepas de *B. bassiana* sobre la broca del café *H. hampei*.

Cepas	Patogenicidad (porcentaje de adultos muertos%)
5	28,3f
7	51,66e
14	85,0d
1	85,0d
15	88,33cd
3	88,30cd
23	91,7bc
33	95,0ab
9	98,30a
ES:±1.66	

Medias con letras iguales no difieren según prueba de Tukey al 95% de probabilidad.

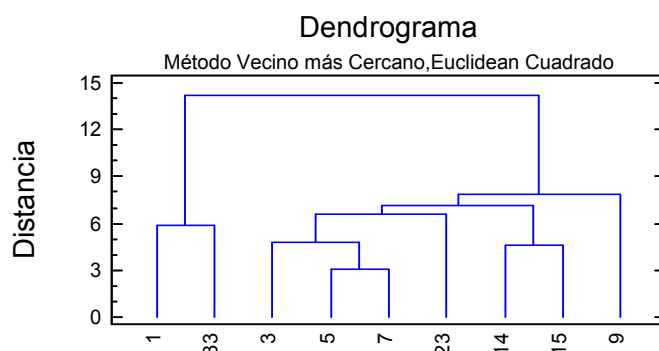
En otro estudio Fernández et al., (2006), informan valores hasta de 100% de mortalidad de larvas de *Boophilus microplus* cuando se inocularon con concentraciones de esporas con exponenciales de  $10^8$  conidia. mL<sup>-1</sup>; aunque, se hallaron aislamientos que no superaron el 25 % cuando las larvas fueron infectadas con titulaciones inferiores de  $10^4$  y  $10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup>.

Por su parte, Talaei-Hassanloui et al., (2006), al realizar evaluaciones de patogenicidad de 10 aislamientos de *B. bassiana* sobre larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) encontraron valores de mortalidad diferentes entre ambas especies, que para la polilla *P. xylostella* los valores estuvieron entre 14,51-53,37%, y en el caso de *L. decemlineata* fueron del 25,05-74,07%, donde se hallaron diferencias significativas en esta variable para varios de los aislamientos estudiados. Del mismo modo, Fürst y Bergleiter, (2015), resaltan la importancia de *B. bassiana* y otros agentes de control de plagas como alternativa eficaz para productores agroecológicos.

Un aspecto muy importante en lo que respecta a la patogenicidad de este hongo es que las referencias se inclinan a la atribución de una mayor variabilidad entre los aislamientos al factor localidad y en menor cuantía al tipo de hospedante; de ahí que en esta investigación también se corrobora esta tendencia en cuanto la existencia de variaciones en la patogenicidad de este hongo respecto a la localidad de origen, lo cual puede estar dado, por la propia acción de la diversidad de condiciones existentes en estos tipos de agroecosistemas montañosos del archipiélago donde han coexistido estos aislamientos.

### Caracterización cultural y bioquímica y conglomeración final de los aislamientos

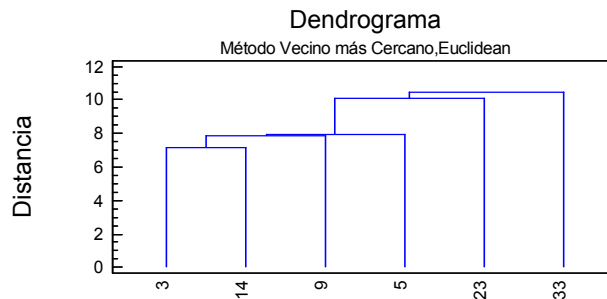
Para el razonamiento más simplificado de los resultados de todas las variables de cultura de los aislamientos, se realizó un análisis multivariado de tipo Cluster en el que se utilizó el método del vecino más cercano con las nueve variables (1. Diámetro de las colonias en el medio PDA; 2. Diámetro de las colonias en el medio SDA; 3. Esporulación en la 1<sup>ra</sup> Trasferencia; 4. Esporulación en la 2<sup>da</sup> Trasferencia; 5. Esporulación en la 3<sup>ra</sup> Trasferencia; 6. Germinación en la 1<sup>ra</sup> Trasferencia; 7. Germinación en la 2<sup>da</sup> Trasferencia; 8. Germinación en la 3<sup>ra</sup> Trasferencia y por último 9. Patogenicidad basada en el porcentaje de mortalidad de los adultos de la plaga) Figura 1.



**Figura 1.** Análisis Cluster del agrupamiento de las cepas autóctonas de *B. bassiana* aisladas de brocas adultas según variables fisiológicas.

El Dendrograma que se obtuvo basado en el análisis de estas variables, facilitó a una distancia de siete la separación de cuatro grupos principales: el primero (Grupo I), que se conformó con los aislamientos (1 y 33) y un segundo (Grupo II), que se dividió en dos subgrupos Subgrupo 1 con los aislamientos tres, cinco y siete; Subgrupo 2 (aislamiento 23); en el Grupo III se incluyeron los aislamientos 14 y 15 y por último el Grupo IV, que estuvo integrado por una sola a cepa (9). Estos resultados del agrupamiento proporcionó la herramienta en la selección de seis cepas para la realización de los ensayos de inducción de la actividad enzimática, que formó parte del análisis integral final.

Para poder determinar la influencia integral del conjunto de todas las variables analizadas (patogénica, cultural, y bioquímica), se procedió nuevamente a un análisis multivariado Cluster, lo cual permitió realizar una mejor selección de los aislamientos caracterizados (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma del agrupamiento de los aislamientos en correspondencia con las respuestas de las variables patogénica, cultural y enzimática.

Se observó nuevamente la formación de grupos tres fundamentales: el primer grupo (GI) conformado por las cepas 3, 14, 9, 5, el segundo grupo (GII) por un solo aislamiento el 23 y por último el GIII con lo ocupó la cepa de referencia nacional (cepa 33). Es importante señalar que los aislamientos 23 de la provincia de Santiago de Cuba y la cepa 33 la Cepa LBB-1 de uso nacional, se ubicaron en grupos individuales respecto a las de origen local, lo cual fundamenta la hipótesis inicial de la existencia de nuevos aislamientos en estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Hongos entomopatógenos del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal INISAV con la cepa nueve de aislamiento local enviada desde el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (Guantánamo, Cuba).

En lo referente a la actividad enzimática se informa como un método muy provechoso para determinar diferenciaciones de patogenicidad, resistencia a condiciones de estrés y para mejorar la capacidad de biocontrol sobre diferentes plagas, González et al., (2007), Fang et al., (2009), Xie et al., (2012).

En lo referente a la actividad enzimática) informan que la sobreexpresión de la quitinasa Bbchit1 repercutieron en un incremento de la virulencia del hongo *B. bassiana*. Los transformantes de *B. bassiana* que segregaban una fusión de la proteasa y la quitinasa (CDEP1:Bbchit1), penetraron la cutícula del insecto más rápido, con una disminución de la dosis letal media en un 60.5%. Este estudio contribuye en gran medida a lograr un avance significativo hacia el desarrollo de patógenos de insectos hipervirulentos para un control de plagas efectivo. Del mismo modo, es común emplear aditivos en las formulaciones que mejoren la efectividad de diferentes hongos que se utilizan como agentes de control de plagas y dentro de estos aditivos se encuentra la quitina, lo cual ha sido comunicado por González et al., (2007), los que realizaron estudios acerca de la concentración óptima de quitina en una formulación con pellet de alginato de sodio, con el objetivo de aumentar la producción de conidios de la cepa Qu-B306 de *B. bassiana*.

## **Conclusiones.**

Se plantea que estudios de esta naturaleza brindan métodos simples y sensibles que pueden usarse de manera satisfactoria en la caracterización de organismos entomopatógenos, además de permitir la determinación precoz de posible variabilidad genética atribuidas a la presencia o ausencia de una enzima específica; aspectos que se han podido corroborar en los resultados de

esta investigación, ya que los medios de cultivo empleados son sencillos, baratos en los cuales utilizan volúmenes muy pequeños; de igual forma, el método permite en pocos días después de la inducción realizar las determinaciones, que unido a la consideración de variables de tipo patogénica y cultural con el apoyo de herramientas estadísticas de análisis multivariado constituyen herramientas a tener en cuenta para la evaluación del desempeño de este hongo en el proceso de selección de cepas promisorias.

### **Agradecimientos.**

A los colegas de la división de protección de plantas del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria CENSA; los especialistas del Centro de Biotecnología Industrial CEBI de la Universidad de Oriente; al Dr. C. Everton Kort Kamp Fernandes y a la Dra. Aurea del Instituto Osvaldo Cruz por su apoyo científico; al Ministerio de Educación Superior de Cuba, por su apoyo financiero y coordinación general de la investigación.

### **Bibliografía.**

- Benavides, P.; Góngora, C.; and Bustillo A. (2015). IPM Program to Control Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé. Colombia. Disponible en [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- Cradock, K. R. and Needham, G. R. (2011). *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a management agent for free-living *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Ohio. *Exp Appl Acarol*, 53, 57–62.
- Chandler, D.; Bailey, A.S., Tatchell G. M.; Davidson, G.; Greaves, J. and Grant, W.P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. University of Warwick institutional repository: Disponible en <http://go.warwick.ac.uk/wrap>
- Fang, W.; Feng, J.; Fan, Y.; Zhang, Y.; Bidochka, M.J.; St. Leger, R.J.; Pei. Y. (2009). Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J Invertebrate Pathol*, 102, 55-159.
- Fernandes, K.K.E.; Rangel, N.E.D.; Braga, L.U.G and Roberts, W.D. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics. Microorganisms and Organelles*.
- Fernández, T.A.; Castañeda, H.E.; Simón, R.F.; Fernandes, K.K.E.; Durán, C.I.J. and Fuentes, B.O. (2013). Contribution of Different Agronomic Practices and the Fungus *Beauveria bassiana* on the Coffee Berry Borer. USA. *Life Sciences*, 7(9), 980-992.
- Fürst, M., Bergleiter, S. (2015). Biological Control of Coffee Berry Borer in Organic Coffee. *Naturland – Association for Organic Agriculture, Germany. Naturland*, 1-4.
- González, I.; Infante, D.; Peteira, B.; Martínez, B.; Arias, Y.; González.; Miranda, I.N. (2010). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Protección Vegetal*, 25,28-35.
- Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Vega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol*, 55,113-128.
- Peteira, B.; González, I.; Arias, Y.; Fernández T.A.; Miranda, Ileana, B. M. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin. *Protección Vegetal*, 26 (1),16-23.

- Rodríguez, C. L. M.; Góngora, B. E. C. (2005). Transformación de *Beauveria bassiana* Bb9205 con genes de *pr 1J* y *ste1* de *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su patogenicidad sobre la broca del café. *Entomología*, 31(1), 51-58.
- Sánchez, L.; Rodríguez, M. (2008). Potencialidades de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa HC1 para el manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. II. Compatibilidad con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y endosulfan. *Protección Vegetal*, 23, 104-111.
- Senthilrajaa, G.; Ananda, T.; Durairajb, C.; Kennedyb, J.S.; Sureshb, S.; Raguchandera, T.; Samiyappana, R. (2010). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leaf miners and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, 20, 449-464.
- Shang, Y.; Duan, Z.; Huang, W.; Gao, Q and Wang, C. (2012). Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *Invertebrate Pathology*, 109, 105-109.
- Talaei-Hassanloui, R.; Kharazi-Pakdel, A.; Goettel, M.; Mozaffari, J. (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16, 525-534.
- Xie, QX.; Li, F.; Ying, HS and Feng, GM. (2012). Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE*, 7(1), 1-12.
- Yew, L.C.; Said, S.A.; Mohd, N.H.; Dzolkifli, O. and Abood, F. (2013).. Effects of UV and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). *Entomology*, 10(2), 53-65.
- Zhanga, Y.J.; Fengb, M.G.; Fana, Y.H.; Luoa, Z.B.; Yanga, X.Y.; Wua, D.; Peia, Y. (2008). A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology*, 18, 543-555.
- Zheng, Y.; Wozniak, C.A. (1997). Adaptation of a 1,3  $\beta$ -glucanase assay to microplate format. *Biotechniques*, 22, 922-926.

**Fecha de recibido: 12 jul. 2016**  
**Fecha de aprobado: 6 sep. 2016**