

CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA Y BIOLÓGICA DE AISLADOS CUBANOS DE *METARHIZIUM* SPP. PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE *CYLAS FORMICARIUS* FABRICIUS.

Yohana Gato⁽¹⁾, Yamilé Baró⁽¹⁾, Ángela Porras⁽¹⁾, Yaremis Ulloa⁽¹⁾, Yuramis Quesada⁽¹⁾, Olga García⁽¹⁾ y María E. Márquez⁽²⁾.

RESUMEN

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* es uno de los más empleados en el control biológico de plagas agrícolas en Cuba. En la actualidad se están desarrollando investigaciones para la obtención y selección de nuevas cepas, adaptadas a las condiciones climáticas con un mejor control sobre las plagas dianas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características morfológicas, culturales y fisiológicas de siete aislados nativos de *Metarhizium* spp. con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius. Se describió la morfología de las colonias y se hallaron las dimensiones de los conidios. Se calculó la tasa de crecimiento y el nivel de esporulación en diferentes medios de cultivo. Además se determinó el crecimiento y el efecto de su exposición a las temperaturas de 28, 30, 32, 34 y 37°C. Los aislados evidenciaron actividad patogénica frente a *C. formicarius* y se demostró, en base a las descripciones obtenidas, que pertenecen al complejo de especies de *M. anisopliae*. Los resultados indicaron que el rango de temperatura favorable para el desarrollo de los cultivos fue de 28-30°C. Los aislados LBM-5 y LBM-10, mostraron mayor tasa de crecimiento a las temperaturas probadas, así como en los medios de cultivo evaluados. La mayor concentración de conidios la manifestaron LBM-5 y LBM-267 en Medio Completo, Agar Dextrosa de Saboraud y Extracto de Malta.

Palabras clave: Caracterización, *Metarhizium* spp., *Cylas formicarius*, control biológico.

Morphofisiologic and biologic characterization of *Metarhizium* spp. cuban isolates promising for the *Cylas formicarius* Fabricius control.

(1) Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Calle 110 # 514 e/ 5^{ta} B y 5^{ta} F, Playa, La Habana, Cuba, ygato@inisav.cu

(2) Universidad de la Habana, Calle M e/ 19 y 21. No.255. Vedado. maria.elena@rect.uh.cu

ABSTRACT

The entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* is one of the most used for the biological control of agriculture pest in Cuba. Nowadays the research's are applies to the isolation of new strains, of good climatic conditions adaptation and therefore get a better control of target pest. The objective of this work was studied morphological, cultural and physiological characteristics of seven new isolates of *Metarhizium* spp. with pathogenic activities against *Cylas formicarius* Fabricius. The isolates were described take into account colonies morphology and conidia measurements. The fungus growth rates and sporulation level was calculated at different culture medium. Also the growth at different temperatures (28, 30, 32, 34 and 37°C) was determinates. The isolates showed pathogenic activities against *C. formicarius* and was demonstrated that are included in the *M. anisopliae* species complex considering the descriptions obtained. These results indicated that best temperature range for the growth of the cultures was 28-30°C. The isolates LBM-5 and LBM-10 showed the highest growth rates at the temperatures and culture medium evaluated. The highest conidia concentration was showed by LBM-5 and LBM-267 in Complete Media, Saboraud's Dextrose Agar and Malt Extract Agar.

Key words: Characterization, *Metarhizium* spp., *Cylas formicarius*, biological control

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Metarhizium* se emplean de El tetúan del boniato, *Cylas formicarius* Fabricius manera intensiva como agente de control (Coleoptera: Brentidae), constituye una de las biológico de insectos y artrópodos plagas, por su principales limitantes de la producción del cultivo amplia gama de organismos diana. Además del boniato (*Ipomea batatas* L.), por los daños produce bajo impacto sobre el ambiente y la que ocasiona al tubérculo en nuestro país y a fauna benéfica. Una de las principales nivel mundial, (Jiménez y del Pozo, 2010; Reddy desventajas del uso de *Metarhizium* en el control *et al.*, 2014). Esta plaga se controla de manera biológico es su susceptibilidad a diferentes eficaz con hongos entomopatógenos entre los factores ambientales, como la temperatura y la que se encuentra *M. anisopliae* Metschnikoff radiación solar (Souza *et al.*, 2014). (Sorokin) y *M. brunneum* Petch (Reddy *et al.*, 2014).

La variabilidad que ocurre en cuanto al rango de hospederos, velocidad de germinación, producción de conidios, crecimiento micelial,

resistencia a diferentes temperaturas y transfirieron a tubos de ensayo con Medio virulencia, hace necesario la selección y la Completoy se guardaron a 4 °C (10 réplicas caracterización de nuevas cepas para el por aislado) para la ejecución de los ensayos.

desarrollo de bioinsecticidas (Torres *et al.*, 2013).

Caracterización cultural y morfológica

El presente trabajo tuvo como objetivo aislado a 10^7 conidios/ml de la que se tomó 0.1 ml y se realizó la siembra de manera superficial fisiológicas de nuevos aislados nativos de con espátula de Drigalski. Las placas se *Metarhizium* spp. con actividad patogénica frente incubaron en la oscuridad a 26°C. A las 72 h se a *C. formicarius*.

Se preparó una suspensión conidial por cada cada aislado estudiado). Se transfirieron discos de 4 mm al centro de placas de *Petri* de 9 cm de diámetro con Agar Papa Dextrosa (PDA), que fueron incubadas bajo las mismas condiciones anteriores (5 réplicas por cada aislado estudiado).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se empleó como material biológico los aislados LBM-5, LBM-10, LBM-12, LBM-41, LBM-42, LBM-146 y LBM-267 del género *Metarhizium*, pertenecientes a la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

Se realizó una suspensión conidial de cada aislado a la concentración de 10^7 conidios/ mL y se efectuó la reactivación sobre 10 adultos jóvenes de segunda generación de *C. formicarius*, obtenidas en condiciones de laboratorio, con la finalidad de evaluar y potenciar la acción entomopatogénica del hongo frente a esta plaga. Posteriormente los insectos muertos se colocaron en cámara húmeda a temperatura de 25 °C. El hongo se reaisló en Medio Completo con antibióticos (rosa bengala y cloranfenicol) y se obtuvieron cultivos monoconidiales. Los aislados se

Se realizaron observaciones del crecimiento de los aislados a partir de las 72 horas y hasta los 14 días que duró el ensayo. Se determinaron las características culturales teniendo en cuenta: el diámetro de la colonia, color, borde, textura, pigmentación del medio de cultivo y patrón de esporulación.

Se describió la morfología de los conidios, fiálides, conidióforos y se midió su talla (largo x ancho) en microscopio de contraste de fase (Aumento: 400 y 1000x objetivo). Se midieron 50 conidios y fiálides por aislado y se consideraron los valores extremos y mínimos. La identificación de los aislados de *Metarhizium* se realizó con ayuda de las descripciones de Driver *et al.* (2000) y Bischoff *et al.* (2009).

Caracterización fisiológica

- **Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados y el nivel de esporulación en diferentes medios de cultivo**

La determinación de la tasa de crecimiento en diferentes medios de cultivo se realizó según el método de Onofre *et al.* (2001). Los medios empleados fueron: Agar Dextrosa de Saboraud (SDA), Agar Papa Dextrosa (PDA), Medio Completo (MC), Extracto de Malta (EM), Agar Czapek- Dox (ACD) y se describieron las características culturales de los aislados.

- **Evaluación de la tasa de crecimiento de los aislados a diferentes temperaturas**

Se evaluó la tasa de crecimiento de los aislados a las temperaturas 28, 30, 32, 34 y 37°C según procedimiento descrito por Rangel *et al.* (2010).

Análisis estadístico

Los datos del crecimiento de los aislados en diferentes medios de cultivo y a las temperaturas evaluadas, así como el nivel de esporulación, se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA). Se utilizó el programa StatSoft (versión 6.0). Las medias se docimaron mediante la Prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados evaluados presentaron actividad

mortalidad en los individuos tratados, emersión del hongo y esporulación durante el proceso de reactivación.

Caracterización morfológica y cultural

En la caracterización morfológica y cultural de los aislados estudiados a los 14 días se evidenció variabilidad morfológica entre ellos. Se observaron diferencias en las características de las colonias en cuanto al color, patrón de esporulación, producción de exudados y pigmentación del medio, así como en las dimensiones de los conidios.

Las observaciones morfológicas sugieren que las colonias de los aislados varían en diferentes aspectos (Figura 1). Los aislados LBM-10 y LBM-12 presentan abundante micelio aéreo. El diámetro de las colonias de LBM-5, LBM-12, LBM-146 y LBM-267, después de un período de incubación a 26°C por 14 días, estuvo entre los 7,2-7,9 cm. El resto de los aislados presentaron valores inferiores en cuanto a la dimensión de las colonias, destacándose LBM-42 con el menor valor (4,4 cm). Los bordes de las colonias de todos los aislados fueron regulares excepto para LBM-146. El reverso de la colonia mostró coloración variada: carmelita (LBM-12, LBM-41), beis (LBM-5, LBM-10, LBM-146, LBM-267) y anaranjado (LBM-42).

Las características observadas en nuestros ensayos están en correspondencia con las descripciones obtenidas por Driver *et al.* (2000) y Bischoff *et al.* (2009) para el complejo de especies de *M. anisopliae*.

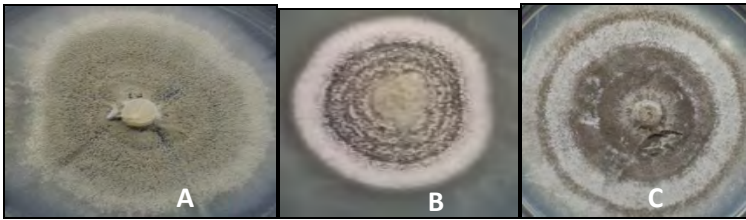


Figura 1. Características culturales de los aislados en PDA a los 14 días de crecimiento. A) LBM-5, B) LBM-42 y C) LBM-146.

(2009) plantearon que existen aislados del complejo *M. anisopliae* que no se pueden diferenciar por la morfología de los conidios. Según estos autores las colonias del complejo *M. anisopliae* son inicialmente de coloración blanca, durante el desarrollo temprano de los conidios (típicamente de cuatro a siete días), de color amarillo y se convierte en verde con la maduración de los conidios (10-14 días). En nuestro estudio se observó que la esporulación varió en distintas tonalidades desde verde grisáceo a verde olivo intenso y el tamaño de los conidios se solapó entre diferentes aislados. Los resultados obtenidos demostraron variabilidad en los caracteres evaluados con la maduración de los conidios (relación al tamaño y forma de los conidios que se solapó entre los diferentes aislados). Por tanto, se resalta la necesidad y la importancia del empleo de técnicas y análisis moleculares, por ser más precisos y óptimos, para diferenciar entre especies del complejo *M. anisopliae*.

Se obtuvo para todos los aislados un patrón de conidióforo típico de *Metarhizium* (Figura 2A). La **Caracterización fisiológica** forma y los valores de longitud de los conidios En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los 9 aislados están solapados. La dimensión de la evaluación del crecimiento de la colonia y de los conidios estuvo en dos rangos, de 4,88-9,76 μm (LBM-5, LBM-10, LBM-12, LBM-41, diferentes medios de cultivo. LBM-42, LBM-267) y de 2,44-7,32 μm (LBM-146). En el diámetro de la colonia de cada uno de los La forma de los conidios es similar, desde aislados se evidenció diferencias significativas cilíndricos a elipsoidales (Fig. 2B) lo que en los medios de cultivo evaluados. Cuando corresponde con lo informado por los autores analizamos el comportamiento de todos los mencionados anteriormente. Bischoff *et al.* aislados para cada medio ensayado se obtuvo

diferencias. En el caso de LBM-5 y LBM-10 se LBM-42, los cuales tuvieron mejor obtuvo mayor crecimiento, se observó un comportamiento en PDA y MC respectivamente comportamiento similar en los medios SDA, EM, (Tabla 1).

MC y PDA, con diferencias significativas en ACD. El mayor crecimiento de la colonia se obtuvo en SDA, excepto para LBM-12 y LBM-41,

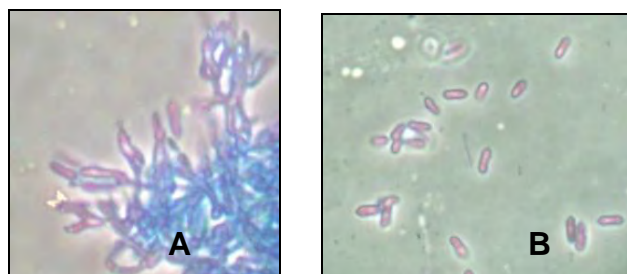


Figura 2. Características morfológicas de los aislados A) fiálides con desarrollo de conidios de LBM-5, B) conidios de LBM-12.

Tabla 1. Diámetro del crecimiento de la colonia (cm) de los aislados de *Metarhizium* evaluados en diferentes medios de cultivo a los 10 días de incubación.

Aislados	Medios de cultivo				
	SDA	PDA	MC	EM	ACD
LBM-5	5,17 ^{abc}	4,80 ^{ab}	4,97 ^{abc}	4,73 ^{ab}	2,67 ^c
LBM-10	5,22 ^{ab}	4,98 ^a	5,12 ^{ab}	4,82 ^a	2,76 ^c
LBM-12	3,30 ^e	4,90 ^{ab}	3,93 ^{ef}	4,47 ^{abc}	2,83 ^c
LBM-41	4,62 ^{cd}	3,78 ^c	4,78 ^{bcd}	3,04 ^d	4,12 ^a
LBM-42	3,48 ^e	3,10 ^d	3,68 ^f	3,02 ^d	3,58 ^b
LBM-146	4,13 ^d	4,57 ^{ab}	3,53 ^f	3,90 ^c	3,03 ^{bc}
LBM-267	4,27 ^d	4,60 ^{ab}	4,07 ^{def}	4,10 ^{bc}	2,43 ^c

Leyenda: Las letras comunes indican que no hay diferencias significativas en esas variantes. Test de significación 0,05.

Las diferencias entre los aislados de así como sales minerales en los medios que *Metarhizium* estudiados puede deberse a la regulan la germinación del hongo, su composición y cantidad de nutrientes presentes crecimiento hifal y la emergencia del tubo en cada medio de cultivo, además de la germinativo (Obando *et al.*, 2013; Zimmermann, presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, 2007).

los medios de cultivo que garanticen mayor En cuanto a la concentración de los conidios, el producción de conidios para cada aislado en análisis de varianza demostró diferencias particular.

significativas en las interacciones aislamiento-medios de cultivo (Tabla 2).

Los medios que favorecieron mayormente la esporulación fueron SDA, EM y MC. En el caso de LBM- 267 y LBM-5 se alcanzó un alto nivel de esporulación en todos los medios evaluados sin diferencias significativas entre estos dos aislados y en SDA se obtuvo el valor más elevado. La menor concentración de conidios se registró con los cultivos de LBM-12.

Los resultados obtenidos permitieron conocer la capacidad reproductiva de los aislados de *Metarhizium* en un medio de cultivo determinado lo que facilita su caracterización en función de la producción de conidios, lo cual presenta utilidad práctica pues permite conocer

Con respecto a la temperatura los valores de 28 y 30 °C fueron favorables para el desarrollo de

los aislados de *Metarhizium* evaluados. Este resultado fue similar al obtenido por Torres *et al.* (2013) quienes obtuvieron la temperatura óptima para el desarrollo micelial de aislados de *M. anisopliae* en el rango de 25-30° C.

Se observó una disminución de la tasa de crecimiento micelial a temperaturas superiores a los 30°C, esta afectación se hizo marcada a los 34°C y no se observó crecimiento alguno a 37°C. A 28 y 30°C se registraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre los aislados, se evidenció para LBM-5, LBM-10 y LBM-41 un comportamiento semejante y mejor desarrollo a esas temperaturas (Tabla 3).

Tabla 2. Nivel de esporulación (10^5 .conidios.mm⁻²) de los aislados de *Metarhizium* evaluados en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Aislados						
	LBM-5	LBM-10	LBM-12	LBM-41	LBM-42	LBM-146	LBM-267
SDA	466,2 ^c	126,3 ^b	76,9 ^{ab}	145 ^{ab}	141,9 ^{bc}	134,3 ^a	568,8 ^c
PDA	36,7 ^a	13,8 ^a	4,58 ^a	6,7 ^c	12,5 ^a	61,7 ^c	37,9 ^a
MC	251,2 ^b	300,6 ^c	298,3 ^c	330,3 ^d	308,3 ^d	187 ^d	326,3 ^b
EM	350,4 ^{bc}	166,7 ^b	151,3 ^b	174,9 ^b	199,9 ^c	107,5 ^a	379,6 ^b
ACD	15,4 ^a	31,7 ^a	23,8 ^{ab}	83,5 ^a	78,5 ^{ab}	157,5 ^b	5,4 ^a

Leyenda: Las letras comunes indican que no hay diferencias significativas en esas variantes. Test de significación 0,05.

Tabla 3. Comparación del crecimiento de la colonia (cm) de los aislados de *Metarhizium* a las temperaturas ensayadas a los 10 días de incubación.

Aislados	Temperatura				
	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
LBM-5	5,40 ^{ab}	5,40 ^a	4,40 ^a	1,90 ^b	-
LBM-10	5,16 ^b	5,16 ^{ab}	3,35 ^b	2,92 ^a	-
LBM-12	3,97 ^{cd}	3,77 ^c	1,97 ^e	0,77 ^d	-
LBM-41	5,92 ^a	5,08 ^{ab}	2,78 ^{cd}	*	-
LBM-42	4,44 ^c	4,18 ^c	2,60 ^{cd}	*	-
LBM-146	3,70 ^d	4,33 ^{bc}	2,47 ^{cde}	1,40 ^c	-
LBM-267	4,00 ^{cd}	4,33 ^{bc}	3,07 ^{bc}	0,70 ^d	-

Las letras comunes indican que no hay diferencias significativas en esas variantes. Test de significación 0,05. (*) crecimiento y esporulación en el ponchete. (-) sin crecimiento.

A 32°C se observó que LBM-5 tuvo mayor esporulación, pigmentación del medio de cultivo desarrollo de la colonia y diferencias y la morfología de la colonia, lo cual se hizo significativas con el resto de los aislados. Con marcado a 34°C. Souza *et al.* (2014) plantearon respecto al crecimiento de la colonia de los que la resistencia a temperaturas superiores a aislados cuando se expusieron a 34°C se 30°C está estrechamente relacionada con la alcanzó menor valor comparado con las presencia de proteínas hidrofóbicas de la pared temperaturas inferiores. En el caso de LBM-10 celular de los conidios, que protegen al hongo se obtuvo mayor crecimiento de la colonia, así del estrés térmico. Este factor ambiental es como, LBM- 41 y LBM-42 manifestaron relevante para la eficacia de agentes crecimiento incipiente en el centro de las placas microbianos fúngicos como las especies del a esta temperatura. género *Metarhizium* por incidir en su En nuestros experimentos pudimos verificar crecimiento vegetativo y persistencia en el que la temperatura incidió en el crecimiento campo. En este estudio se constató la micelial de los aislados evaluados, y en los variabilidad intraespecífica de aislados del caracteres culturales como el patrón de complejo *M. anisopliae* patogénicos a *C.*

fomicarius y evaluados con respecto a la producción de conidios, tasa de crecimiento, respuesta a diferentes temperaturas. La variabilidad en las características estudiadas evidenció la importancia del empleo de otras técnicas de caracterización para la selección de cepas promisorias de biocontrol. Esto es elemental no solo para el conocimiento básico de las cepas, sino para su posterior aplicación en el control biológico y específicamente para el desarrollo de bioproductos con un alto impacto en el control de plagas agrícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bischoff J, Rehner S, Humber R. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 2009; 100(4): 512-530.
- Driver F, Milner R, Trueman J. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of r DNA sequence data. *Mycol Res*. 2000; 104:134-150.
- Jiménez LC, del Pozo E. Patogenicidad, virulencia y potencial reproductivo de *Heterorhabditis bacteriophora* (cepa HC1) sobre *Cylas formicarius* var. *elengatus*. *Protección Vegetal*. 2010; 25(2):1-9.
- Obando J, Bustillo A, Castro U, Mesa N. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 2013; 39(1):26-33.
- Onofre S, Miniuk C, Monteiro N, Azevedo J. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimens. *Scientia Agricola*. 2001. 58(3): 613-616, 2001.
- Rangel DE, Fernandes ÉK, Dettenmaier SJ, Roberts DW. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. *Journal of Basic Microbiology*. 2010; 50: 344–350.
- Reddy G, Zhao Z, Humber R. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2014; 122: 10-15.
- Souza R, Azevedo R, Lobo A, Rangel D. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 2014; 24 (4):448-461.
- Torres M, Cortéz H, Ortiz C, Capello S, de la Cruz A. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*. 2013; 39(1):40-46.
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 2007; 17 (9): 879-920.