



**Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía**

Título: Activación de la viruencia de la cepa de *Beauveria bassiana* (Bals), Bb 111 nativa de Sancti Spiritus sobre *Cylas formicarius* L.

Autor: Roberlandy Marrero Caballero

Sancti Spíritus, 2019



**Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía**

Título: Activación de la virulencia de la cepa de *Beauveria bassiana* (Bals), LBb 111 nativa de Sancti Spíritus sobre *Cylas formicarius* L.

Autor: Roberlandy Marrero Caballero

Tutor: Lic. Marcia María Rodríguez Jáuregui

Sancti Spíritus, 2019

RESUMEN

La investigación presenta los resultados de la activación de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* aislada de ecosistemas cafetaleros, para lo cual se tuvo como objetivo evaluar su virulencia después de realizado el protocolo de activación sobre *C. Formicarius*, donde se determinó la mortalidad, CL-50, DL-90 y TL 50 para *B. bassiana* y su eficacia. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de la provincia de Sancti Spiritus, y en el laboratorio III (Bioproductos de usos agrícola) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en dos períodos, de diciembre del 2017 a junio del 2018 y de diciembre 2018 a enero 2019. Se montó un diseño experimental aleatorizado con 5 tratamientos (5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 y 5×10^4 conidios por ml en agua destilada) y 4 réplicas. Como resultado se obtuvo que la mortalidad de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* activada resultó dos veces más potente que la cepa sin activar al presentar una CL 50 de $7,500 \times 10^6$, La cepa LBb 111 de *B. bassiana* sin activar necesito el doble del tiempo para matar al 50% de los insectos, La activación de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* demostró una mayor eficacia, donde las concentraciones 5×10^7 , 5×10^5 y 5×10^4 fueron las que alcanzaron los mayores valores en relación a la cepa no activadas.

ABSTRAT

The research presents the results of the activation of strain LBb 111 of *B. bassiana* isolated from coffee ecosystems, for which purpose it was aimed to evaluate its virulence after carrying out the activation protocol on *C. formicarius*, where mortality was determined, CL-50, CL-90 and TL 50 for *B. bassiana* and its efficacy. The experiments were carried out in the Provincial Plant Health Laboratory of the Province of Sancti Spíritus, and in Laboratory III of the Faculty of Agricultural Sciences, in two periods, from december 2017 to june 2018 and from december 2018 to january 2019. A randomized experimental design was set up with 5 treatments (5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 and 5×10^4 conidia per ml in distilled water) and 4 replications. As a result it was obtained that the mortality of the LBb 111 strain of *B. bassiana* activated was twice as potent as the strain without activating when presenting a CL 50 of $7,500 \times 10^6$, The strain LBb 111 of *B. bassiana* not activated needed the double of time to kill 50% of the insects, The activation of strain LBb 111 of *B. bassiana* showed greater efficacy, where the concentrations 5×10^7 , 5×10^5 and 5×10^4 were those that reached the highest values in relation to the non-activated strain.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
Problema	3
Hipótesis	3
Objetivos	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Origen del Boniato (I. batata) y su dispersión	5
2.2 Ubicación taxonómica	6
2.3 Importancia económica del cultivo	6
2.4 Plagas y enfermedades.	7
2.5 El Tetuán del boniato	7
2.5.1 Ciclo de vida	8
2.6 <i>B. bassiana</i>	9
2.6.1 Ciclo y vía de infección de <i>B. bassiana</i> .	10
Principales formulaciones de <i>B. bassiana</i> usados en el control de plagas	12
2.7 Activación de la virulencia	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Determinar la CL-50, CL-90 y TL 50 para <i>B. bassiana</i> después de realizado el proceso de activación sobre <i>C. formicarius</i> .	17
3.2 Determinación de la eficacia de la cepa LBb 111 de <i>B. bassiana</i> después de realizado el proceso de activación sobre <i>C. formicarius</i> .	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Determinar la CL-50, CL-90 y TL 50 para <i>B. bassina</i> después de realizado el proceso de activación sobre <i>C. formicarius</i> .	19
4.1.2 Determinación de la mortalidad de <i>C. formicarius</i> .	19
4.1.2 Determinación de la Concentración Letal media (CL 50 y CL 90)	20
4.1.3 Determinación del Tiempo Letal medio (TL 50)	21
4.2 Determinación de la eficacia de la cepa LBb 111 después del proceso de activación.	22
CONCLUSIONES	24

RECOMENDACIONES
BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

El boniato (*Ipomoea batata* L.) constituye un alimento importante, fundamentalmente como fuente de carbohidratos dentro de la dieta del pueblo cubano. Se caracteriza por ser un cultivo con mayor rango de adaptación y estabilidad a las variadas condiciones climáticas de la isla de Cuba, particularmente por su poca exigencia en cuanto a la fertilización y otros aspectos agrotécnicos. Tradicionalmente, el boniato era un cultivo que solamente se encontraba entre agricultores pequeños para el autoconsumo y comercialización en el mercado interno (Maza *et al.*, 2000).

El cultivo, originario de Centro América, es considerado como el quinto cultivo alimenticio más importante del mundo en términos de producción y valor económico, al adaptarse muy bien en los campos de productos marginados, su proceso requiere de pocos insumos y bajos costos de producción (Méndez, 2008).

El boniato es el quinto cultivo alimenticio más importante en Cuba después del arroz, papa, bananos y yuca. La producción total anual es de 220 000 toneladas métricas. Durante la última década, la producción ha bajado a una tasa de 2% (Maza *et al.*, 2000).

Varios factores inciden en los bajos rendimientos del boniato en Cuba. Entre los factores más importantes se destaca el daño producido por el Tetuán (*C. formicarius*. F), el cual es prácticamente la única plaga de importancia en este cultivo. En casos extremos los daños pueden afectar al 100% de las raíces tuberosas (Maza *et al.*, 2000).

Actualmente existe un renovado interés en el uso de hongos entomopatógenos como agentes biorreguladores, de ahí la necesidad de adoptar nuevas tecnologías en el control de plagas orientando las investigaciones hacia el uso de los bioinsecticidas que actúan de manera similar a los plaguicidas convencionales,

pero no presentan las características indeseables de estos, como la resurgencia de plagas, inducción de enfermedades y contaminación del medio ambiente (Méndez, 2008).

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* de amplia distribución geográfica, es considerado como uno de los principales enemigos naturales de plagas y vectores insectiles. Se ha demostrado mediante varios estudios que *B. bassiana* se constituye, en un importante controlador biológico de insectos como *Hypothenemus* sp., *Epitrix* sp., Crysomelidos, *Euscepes* sp. y otros insectos de órdenes coleóptera y lepidóptera (PROBIOMA, 2003).

Se ha demostrado que este hongo entomopatógeno se hospeda en un amplio rango de insectos y posee un potencial como control biológico. Además, tiene ventajas sobre los plaguicidas convencionales, pues persiste en la población de insectos que infecta, reduce su longevidad y ocasiona altas tasas de mortalidad en larvas y adultos. Por lo cual, el género *Beauveria* promete ser uno de los agentes más eficaces y con menores consecuencias para el ambiente cuando se usa en el control biológico de artrópodos; pues se propaga con facilidad, por su capacidad para penetrar la cutícula en una amplia variedad de insectos (Rebolledo *et al.*, 2014).

Para desarrollar programas de control de insectos plagas mediante hongos entomopatógenos es necesario obtener formulaciones que conserven sus características biológicas al ser utilizadas en el campo (Alves y Pereira 1998). La producción industrial de estos hongos se debe iniciar con un organismo cuya viabilidad y eficacia asegure la calidad del producto final, para ello se requiere que estos se pasen o se activen sobre el insecto al cual van dirigidos y así conservar sus propiedades patogénicas y su virulencia (Bustillo y Marín, 2002).

Existen muchos procesos de laboratorio documentados en la literatura (Alves *et al.*, 1998) para trabajar con insectos, pero muy poca información sobre los detalles

para la reactivación o incremento de la virulencia de hongos a partir de insectos sanos. El proceso de reactivación de la virulencia del hongo no es difícil pero hay que tener acceso a colonias sanas del insecto en estudio y un equipo básico de materiales y elementos en un área aséptica para evitar la contaminación. Un programa de investigación con entomopatógenos implica la necesidad inicial de obtener los aislamientos más eficientes y el desarrollo de un bioensayo confiable que permita la selección del mejor entomopatógeno sobre el hospedante a controlar (González *et al.*, 1993, Prior *et al.*, 1995).

Los procesos sobre almacenamiento y preservación de la virulencia de los hongos entomopatógenos en diferentes sustratos han sido recientemente estudiados por Alves *et al.* (1996) y Bahamon *et al.* (2001).

En el laboratorio provincial de Sanidad Vegetal de la provincia de Sancti Spíritus fue aislado la cepa LBb 111 de *B. Bassiana* parasitando de forma natural a *Hypothenemus hampei*, la cual ha constituido por varios años la cepa más usada en el control de insectos plagas en toda la provincia, dado en lo fundamental por su gran virulencia y eficacia. En los últimos años debido a un mal manejo, esta cepa ha perdido su virulencia y por ende su capacidad de matar, por lo que fue necesario la introducción de una nueva cepa la LBb1234 procedente del INISAV.

Problema científico

Las malas prácticas en el manejo y conservación de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* autóctona de la provincia de Sancti Spíritus, ha traído como consecuencia la pérdida de su virulencia.

Hipótesis

A partir del establecimiento de un protocolo de activación, basado en realizar pases sucesivos sobre insectos diana se podría lograr activar la virulencia de la cepa autóctona de la provincia de Sancti Spíritus LBb 111 de *B. bassiana*.

Objetivo general

Evaluar la virulencia de la cepa autóctona LBb 111 de *B. bassiana* de la provincia de Sancti Spiritus después de realizado el protocolo de activación sobre *C. formicarius*.

Objetivos específicos

1. Determinar la CL-50, DL-90 y TL 50 para *B. bassiana* después de realizado el proceso de activación sobre *C. formicarius*.
2. Determinar la eficacia de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* después de realizado el proceso de activación sobre *C. formicarius*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen del Boniato (I. batata) y su dispersión

Existen varias hipótesis acerca del origen del boniato, la primera lo sitúa en el continente americano, desde el sur de México, Guatemala, Honduras y Costa Rica, por la gran diversidad del material genético que se encuentra en la zona ; la segunda plantea, que es originario de Asia, fundamentalmente de China; una tercera hipótesis lo sitúa en la zona que ocupa México y Centroamérica, o bien Perú por las evidencias arqueológicas de su antigüedad. Según Soto, (1992), Guatemala es el subcentro de origen del boniato. La palabra "camote" es de origen Nahuatl, dialecto de los antiguos habitantes de Centroamérica y México; conocido también como batata o boniato, este cultivo tiene una larga historia como salvavidas (CIP, 2002).

Existen evidencias de que este cultivo es de origen americano y aunque se discute el sitio exacto, todo parece indicar de acuerdo a los últimos trabajos, que es la zona noroeste de Suramérica, tanto por la diversidad del material genético como por la evidencia arqueológica de la antigüedad de su cultivo. Lo cierto es que este es el único cultivo de los trópicos americanos que se conocía fuera del continente, antes de la llegada de Cristóbal Colón (Rodríguez *et al.*, 2003).

Su dispersión hacia Europa fue gracias a Cristobal Colón en su viaje de 1492 al regresar a España, en el cual transportó el boniato entre otras especies y lo mostró como nuevo en el viejo mundo, citado por De Candole, (1984), expuso que la batata fue llevada hacia España, luego a Manila y las Molucas, donde los portugueses lo extendieron al archipiélago indio y que probablemente se introdujo en Japón en 1750.

Roig, (1968), planteó que esta planta ya existía en Cuba antes de la colonización y que los aborígenes la cultivaban casi de la misma forma que

como se cultiva en la actualidad; López, (1995), afirma que este cultivo es de época precolombina y que en la actualidad es una de las viandas más importantes de la población.

2.2 Ubicación taxonómica

El boniato, según Judo *et al.* (1999), se ubica de la siguiente forma:

Reino: Plantae

División: Magnolophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Tribu: Ipomeae

Género: Ipomoea

Especie: *Ipomoea batatas*(L.) Lam.

Esta especie fue descrita por Linneo en 1753 como *Convolvulus batatas*. Sin embargo, en 1791 Lamarck, clasificó dentro del género *Ipomoea* en base a la forma del estigma y a la superficie de los granos de polen. Por tanto el nombre fue cambiado a *Ipomoea batatas* (L.) Lam (Huamán, 1992).

2.3 Importancia económica del cultivo

El boniato es uno de los cultivos más conocido en el mundo, ya que se consume en más de 100 países, casi todos enclavados en la faja tropical del planeta, aunque el 95% de la producción mundial es cosechada en países en vías de desarrollo. Es el quinto en importancia después del arroz, trigo, maíz, y la yuca, con una producción anual que supera los 135 millones de toneladas Sin embargo, en los últimos años la producción de boniato en algunos países se ha mantenido constante y en muchos otros ha disminuido (FAO, 2009).

2.4 Plagas y enfermedades.

Aunque se reportan en el mundo más de 100 agentes causales de plagas, enfermedades, y virus que afectan al cultivo del boniato, en Cuba sólo se citan algunas plagas de importancia económica. Entre ellas podemos citar: el Tetuán (*C. formicarius*), las mantequillas, la araña roja, los crisomélidos y los nemátodos (*Meloidogyne incognita*) (Morales *et al.*, 2001).

Entre las principales plagas de las raíces tuberosas se reconocen las larvas de *Diaprepes spp* (Coleoptera: Curculionidae) y de *Phyllophaga spp* (Coleoptera: carabeidae) así como otras pertenecientes a la familia Elateridae (gusanos de alambre), sin poder determinar las especie en cuestión (Castellón *et al.*, 2015).

2.5 El Tetuán del boniato

En el cultivo del boniato la principal plaga que lo afecta es el tetuán (*C. formicarius*), constituyendo una de las plagas que más daño causa a la planta con afectaciones que oscilan entre el 45 y el 50 % del rendimiento total. Generalmente el inicio de la acción dañina del tetuán, ocurre al final del primer período o de establecimiento e inicio del segundo (período de desarrollo). Su incidencia en el boniato y la cuantía de sus daños está en relación directa con el ciclo del clon: a medida que mayor es el ciclo, mayores son los daños y a la inversa. Esto significa que cada clon posee un período de tiempo diferente desde la presencia del insecto en la planta hasta la cosecha. Este estadío es de hasta 80 días para los clones precoces, de 110 para los de ciclo intermedio y de 130 aproximadamente para los de ciclo tardío (Martínez *et al.*, 2007).

En Cuba se han reportado algunos insectos como plagas del cultivo. Hasta el presente el tetuán (*C. formicarius*), es a la única que se le concede importancia económica. El adulto se alimenta de hojas, esquejes, tallos y raíces tuberosas, pero el daño de consideración lo causa la larva, abriendo galerías en todas

direcciones en las raíces tuberosas. El boniato infestado queda inutilizado para el consumo humano y animal (INIVIT, 2008).

El tetuán adulto se alimenta de cualquier parte de la planta (hojas, peciolos, tallos y raíces tuberosas) sin causar daño económico. El daño importante es causado por las larvas que perforan los tallos y las raíces tuberosas, que se vuelven inservibles hasta para la alimentación animal. La larva induce la formación de furano-terpenoides y cumarinas que dan un sabor amargo, muy desagradable, a la raíz tuberosa. Los tallos infestados cerca del cuello de la raíz se hipertrofian, interrumpiendo el flujo de savia.

2.5.1 Ciclo de vida

La hembra pone sus huevos, blanco-cremosos, aisladamente, en cavidades superficiales en el tallo o en las raíces tuberosas. Cinco a seis días después (a 30 °C), emergen las larvas, que barrenan tallos y raíces tuberosas, durante 16 días en verano (30 °C), a 58 días en invierno (20 °C), hasta medir 7.2 mm de largo. La pupa es de color blanco amarillento y se encuentra en una cámara pupal, en el tallo o en la raíz tuberosa. Después de 6 a 9 días (30 °C y 25 °C) emerge el adulto. Una vez que fija sus colores, la cabeza y proboscis del adulto son negras y lustrosas; el protórax, estrecho, es de color naranja, los élitros, de color azul oscuro; y las patas, de color rojizo. El ciclo total de huevo a adulto, toma de 32 a 40 días. Los adultos son longevos, viven de dos a cuatro meses, o más (INIVIT, (2008).

Las hojas y raíces emiten sustancias volátiles que atraen a las hembras. La larva, una vez que completa su desarrollo dentro de la galería, en el tallo o en la raíz tuberosa, se dirige hacia la superficie y forma la cámara pupal. La actividad de los adultos (alimentación, apareamiento y oviposición) es nocturna. Sin embargo, cuando se usan trampas con feromonas sintéticas, se les ve activos durante todo el día. Los adultos, cuando se les molesta fingen estar muertos (fenómeno de

tanatosis). La distribución de las larvas a lo largo del tallo está influenciada por la lignificación del tejido; la mayoría se encuentra en los 10 cm basales de los tallos y 15 cm debajo del cuello de la raíz (INIVIT, (2008).

2.6 *B. bassiana*

B. bassiana, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Deuteromycetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora (conidial), y de esta manera entra en la clasificación de los hongos superiores (hongos imperfectos) y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos. Se caracteriza por presentar células conidiógenas globosas a sub-globosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) con un cuello muy corto, las estructuras conidiógenas forman grandes grupos, conidióforos apiñados formando sinnemas o grupos de conidióforos muy juntos, las conidias son hialinas y lisas, globosas elipsoidales, raquis en zíg-zag y el desarrollo en medio de cultivo es levantado de color blanco, tomando coloraciones amarillentas en el reverso de la placa cuando tiene mucho tiempo (Castillo, 2015).

Se ha demostrado que el hongo entomopatógeno *B. bassiana* se hospeda en un amplio rango de insectos y posee un potencial como control biológico. Además, tiene ventajas sobre los plaguicidas convencionales, pues persiste en la población de insectos que infecta, reduce su longevidad y ocasiona altas tasas de mortalidad en larvas y adultos. Por lo cual, el género *Beauveria* promete ser uno de los agentes más eficaces y con menores consecuencias para el ambiente cuando se usa en el control biológico de artrópodos; pues se propaga con facilidad, por su capacidad para penetrar la cutícula en una amplia variedad de insectos(Prado *et al.*, 2014),

Los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo. Generalmente los insectos atacados se momifican quedando adheridos en la planta, principalmente en el envés de la hoja (Castillo 2012).

2.6.1 Ciclo y vía de infección de *B. bassiana*.

Primera etapa: Adhesión.

El hongo se adhiere a la cutícula o tegumento del insecto.

Segunda etapa: Germinación.

Sobre la cutícula o tegumento germinan las conidias o esporas encontrando condiciones favorables de humedad y temperatura el hongo germina sobre el insecto produciendo un tubo germinativo, la germinación ocurre en un tiempo mínimo de 12 horas después de la inoculación, a una temperatura que oscila entre 23 y 30 °C y una humedad relativa más o menos elevada.

Tercera etapa: Penetración.

La penetración ocurre vía tegumento por medio de dos procesos: uno que es físico, debido a la presión de las hifas que rompen las áreas membranosas o esclerotizadas de la cutícula del insecto y el otro proceso es químico que resulta de la elaboración de enzimas (proteasas, lipasas y quitinazas) que facilitan la penetración mecánica del hongo.

Cuarta etapa: Multiplicación.

El hongo se multiplica en el hemocele del insecto.

Quinta etapa: Elaboración de toxinas.

Dentro del hemocele del insecto el hongo produce toxinas.

Sexta etapa: Muerte del insecto.

La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, mudanzas patológicas en el hemocele, acción histolítica, bloqueo mecánico del aparato digestivo debido al crecimiento vegetativo del hongo y otros daños físicos debido

al crecimiento del micelio. A partir de la muerte del insecto el hongo crece, desarrollándose dentro de este.

Séptima etapa: Colonización.

A partir de la penetración del hongo en el hemocele del insecto se inicia un proceso de colonización en su hospedero. La hifa que penetra sufre un engrosamiento que se ramifica; inicialmente en el tegumento del insecto y posteriormente en la cavidad general del cuerpo. A partir de este momento se forman pequeñas colonias del hongo. El tiempo para la colonización del insecto puede variar de 76 a 120 horas dependiendo del insecto, el patógeno y de las condiciones ambientales.

Octava etapa: Salida del micelio.

El micelio del hongo sale al exterior del cuerpo del insecto pasando por el tegumento.

Novena etapa: Esporulación.

El hongo esporula sobre la superficie del insecto. La producción de conidios ocurre de 25 a 48 horas después de la emergencia de las hifas en condiciones de elevada humedad y temperatura que oscila entre 20 y 30 °C, esto dependiendo del patógeno.

Décima etapa: Diseminación.

Los propágulos del hongo son diseminados al medio a partir de los insectos colonizados. La duración de las diferentes fases del ciclo en la relación patógeno – hospedero depende de las especies de insectos y de las condiciones climáticas reinantes. Las condiciones favorables son humedad relativa del ambiente de un 90% y temperatura que oscila entre 23 a 28 °C (Méndez, 2008).

2.6.2 Principales formulaciones de *B. bassiana* usados en el control de plagas

Para desarrollar programas de control de insectos plagas mediante hongos entomopatógenos es necesario obtener formulaciones que conserven sus características biológicas al ser utilizadas en el campo. La producción industrial de estos hongos se debe iniciar con un organismo cuya viabilidad y eficacia asegure la calidad del producto final, para ello se requiere que estos se pasen o reactiven sobre el insecto al cual van dirigidos y así conservar sus propiedades patogénicas y su virulencia (Bustillo y Marín, 2002).

El éxito en la utilización de un hongo entomopatógeno como agente biocontrolador requiere considerar los siguientes factores: 1. Selección de una cepa con una alta capacidad patogénica y alta capacidad esporulativa. 2. Selección de un proceso de producción que permita una alta eficiencia en la obtención de esporas y una alta calidad de las esporas. 3. Selección de una formulación que confiera protección a las esporas en campo en condiciones adversas, como son exposición a rayos U.V. y humedades muy bajas, y 4. Aplicación enmarcada dentro de un programa de manejo integrado del cultivo. El presente trabajo está relacionado con el primer factor enunciado. Este trabajo constituye el paso inicial para el desarrollo de un agente biocontrolador para el gusano blanco de la papa. En este artículo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad patogénica de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre adultos del gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache), en condiciones de laboratorio (Rivera y Pinto, 2001).

2.7 Activación de la virulencia

La definición de virulencia más aceptada actualmente en patología de invertebrados es el grado de patogenicidad de un microorganismo dentro de un

grupo o especie. En hongos entomopatógenos la virulencia puede variar con distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno, o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos. La virulencia de hongos entomopatógenos también es frecuentemente relacionada con la rapidez en la germinación y el crecimiento sobre la cutícula de los insectos hospedadores (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005).

Existen muchos procesos de laboratorio documentados en la literatura para trabajar con insectos, pero muy poca información sobre los detalles para la reactivación o incremento de la virulencia de hongos a partir de insectos sanos. El proceso de reactivación de la virulencia del hongo no es difícil pero hay que tener acceso a colonias sanas del insecto en estudio y un equipo básico de materiales y elementos en un área aséptica para evitar la contaminación. Un programa de investigación con entomopatógenos implica la necesidad inicial de obtener los aislamientos más eficientes y el desarrollo de un bioensayo confiable que permita la selección del mejor entomopatógeno sobre el hospedante a controlar (Bustillo y Marín, 2002).

Para reactivar la virulencia de *B. bassiana* se procede como se describe a continuación:

- 1) Se limpia el área donde se va a trabajar con hipoclorito de sodio o alcohol antiséptico (70⁰). Inmediatamente después se prenden los mecheros que se van a utilizar.
- 2) Para la inoculación con el hongo se deben seleccionar insectos adultos de una colonia de laboratorio, que muestren gran actividad. Este material biológico se debe utilizar lo más rápido posible. Los cultivos de los hongos entomopatógenos que se van a utilizar deben estar libres de contaminantes.

- 3) Los beakers, cajas Petri, el A D E, papel filtro y demás material necesario se esterilizan en un autoclave a 121 °C a una atmósfera de presión durante 15 min. Se prepara el medio SDA y se vierte en tubos de ensayo, 8 ml en cada tubo; si se usan botellas planas se adicionan 50 ml del medio. Para preparar las botellas con sustrato de arroz se agregan 50 g de arroz y 50 ml de agua. Luego estos medios se esterilizan en autoclave de la forma antes descrita. Para su solidificación, los tubos se colocan en forma inclinada y las botellas horizontalmente. También se puede preparar el SDA en cajas Petri esterilizadas, adicionando 15 ml del medio previamente esterilizado cuando alcance una temperatura de ± 40 °C.
- 4) Los insectos se desinfectan con hipoclorito de sodio al 0,5 % y se lavan tres veces con abundante agua destilada estéril.
- 5) Posteriormente, los insectos se inoculan por inmersión durante 2 min en 10 ml de la suspensión del hongo a las concentraciones determinadas. Luego se pasan a una caja Petri o recipiente adecuado, que tenga en su interior una toalla de papel esterilizada la cual debe permanecer húmeda para facilitar el desarrollo del hongo sobre el insecto, se le añade alimento previamente desinfestado. Las cajas se deben sellar con un plástico adhesivo Vinilpel" o cinta adhesiva Tesa (Bustillo y Marín, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de entomopatógenos del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de la provincia de Sancti Spíritus, perteneciente al Ministerio de la Agricultura y en el laboratorio III (Bioproductos de usos agrícola) de la facultad de Ciencias Agropecuarias en dos períodos, el primero comprendido de diciembre del 2017 a junio del 2018 y un segundo tiempo de diciembre 2018 a enero 2019.

Para el estudio se utilizó la cepa de *B. bassiana* (LBb 111, aislada de ecosistemas cafetaleros de la provincia). Se montó un diseño experimental aleatorizado con 5 tratamientos (concentraciones) y 4 réplicas.

Los insectos utilizados fueron obtenidos de las crías del laboratorio de Bioproductos de Usos Agrícolas la Facultad de Agronomía de la UNISS y del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV). En todos los tratamientos los insectos utilizados fueron adultos.

En la investigación se utilizaron cinco concentraciones en un amplio rango: 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 y 5×10^4 conidios por ml en agua destilada estéril con Tween 80 al 0,05 % a partir de cepas frescas en tubos de ensayo con Sabouraud Dextrosa Agar como medio de cultivo.

Por cada réplica se tomaron 10 adultos de *C. formicarius* para un total de 40 por concentración. Los mismos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,1 % y lavados dos veces con agua destilada estéril y después tratados por inmersión en las suspensiones del hongo según la concentración, se colocaron en placas petri plástica con un orificio en la tapa con malla metálica para facilitar el intercambio de aire e impedir el escape de los insectos. Las placas debidamente identificadas por cepa y concentración se colocaron en una incubadora marca Boxun a 28°C .

Para alimentar a los insectos mientras transcurría el bioensayo se colocaron rodajas de boniato en las placas, previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 0,1 %.

A partir del segundo día se comenzó a evaluar la mortalidad con una frecuencia diaria. Los insectos muertos se extrajeron y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0,1 % durante 1 min, luego se enjuagaron con agua destilada y estéril dos veces y se colocaron en cámara húmeda sobre papel de filtro en el fondo humedecido e incubar a 28 °C por siete días.

Cuando ocurrió emersión del micelio y esporulación típica del hongo, se observó el insecto bajo el microscopio estereoscópico para confirmar si el agente causante era el hongo según las claves de identificación. Se realizó un periodo de observación y conteo que permitió con la recopilación de estos resultados donde se determinaron la CL 50, CL 90 y TL 50, luego de realizar observaciones diarias y procesando los datos por el paquete estadístico, SPSS, Probit.

Los insectos muertos por la enfermedad causada por el hongo fueron colocados en condiciones estériles y luego a partir de ellos se realizó un bioensayo para aislar la cepa nuevamente, a la que nombramos Cepa Activada sobre el insecto, donde se realizó una técnica de diluciones a partir de una muestra de 3 tetuanes bien esporulados los cuales se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de agua con Tween 80 al 0,05%.

A partir de aquí se prepararon diluciones seriadas y estas fueron vertidas a placas estériles, con medio Sabouraud Dextrosa Agar, donde se vertió de 0,1 a 0,5 ml por concentración y homogenizada sobre el medio con espátula de Drigalski. Las placas se colocaron a incubar entre 26-28 °C, temperatura de incubación para la *B. bassiana* hasta la aparición de colonias, de las cuales luego se hicieron pases a tubos de agar sólido con uso de medio de cultivo SDA usando para ello las UFC aparecidas en las placas 10^2 y 10^3 , Esta activación de la cepa permite

realizar el segundo ensayo de infestación de insectos para lo cual se sigue el mismo procedimiento anteriormente descrito, donde luego del proceso de infestación del tetuán se realizan los cálculos mediante el procesamiento estadístico que a continuación se describe.

3.1 Determinar la CL-50, CL-90 y TL 50 para *B. bassiana* después de realizado el proceso de activación sobre *C. formicarius*.

Se realizaron observaciones diarias y se contó los insectos muertos hasta los 13 días después del tratamiento. Se Calculó el porcentaje de mortalidad acumulada usando los datos del total de muertes ocurridas por el hongo en el tiempo evaluado.

Como la mortalidad en el testigo fue menor del 10 % se corrigieron los valores por la siguiente fórmula:

$$M.C. (\%) = \frac{(\% \text{ de mort. en la prueba} - \% \text{ de mort. Testigo})}{(100 - \% \text{ de mort. en el testigo})}$$

M.C.= mortalidad corregida.

Los datos de los bioensayos se procesaron por el programa PROBIT ANALISIS del paquete estadístico SPSS Versión 21 para calcular la concentración letal media (CL 50), la dosis letal 90 (DL90) y el tiempo letal medio (TL 50) a la concentración de 5×10^7 conidios por ml.

3.2 Determinación de la eficacia de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* después de realizado el proceso de activación sobre *C. formicarius*.

Se calculó la efectividad de cada concentración después de las aplicaciones Para ello se utilizó la fórmula de Henderson-Tifton, tomada de Ciba-Geigy (1981).

$$E=(1-Td/Cd. Ca/Ta).100$$

Donde:Ta: Infestación en parcela tratada antes del tratamiento

Td: Infestación en parcela tratada después del tratamiento

Ca: Infestación en parcela testigo antes del tratamiento

Cd: Infestación en parcela testigo después del tratamiento

Los porcentajes de la eficacia se transformaron por $\left(2\arcsen\sqrt{P/100}\right)$ para que se ajusten a la curva normal de probabilidad. Con los datos promedio se realizó un ANOVA de un factor, para lo cual se empleó el paquete estadístico SPSS – versión 21 para Windows. Los valores de las medias fueron comparadas por la prueba de rango múltiple de Tukey ($p\leq 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinar la CL-50, DL-90 y TL 50 para *B. bassiana* después de realizado el proceso de activación sobre *C. formicarius*.

4.1.2 Determinación de la mortalidad de *C. formicarius*.

La mortalidad causada por la cepa LBb 111 a *C. formicarius* fue superior en la cepa activada en relación a la sin activar y con diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones (Figura 1). Como se puede observar la concentración 5×10^8 fue la que alcanzó la mayor mortalidad para ambas variantes y con diferencias estadística con el resto de las concentraciones.

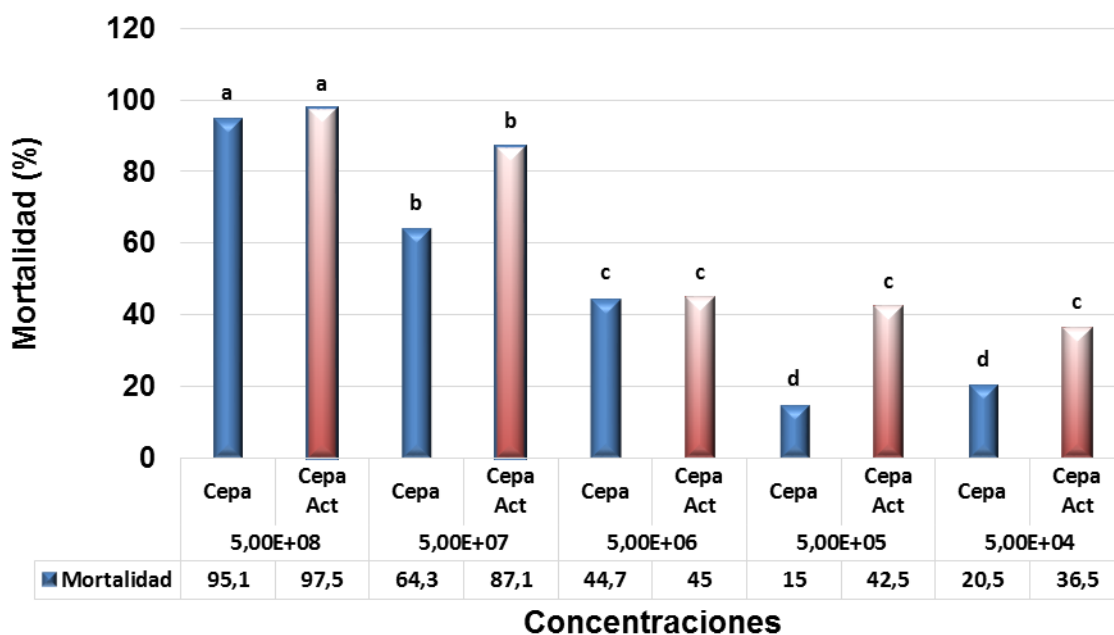


Figura 1. Mortalidad causada por *B. Bassiana* en adultos de *C. formicarius*

Es válido señalar que en las concentraciones 5×10^7 , 5×10^5 y 5×10^4 fue donde se pudo apreciar un mayor efecto de la mortalidad, lo que demuestra que la activación favorece la mortalidad en concentraciones bajas de esporas por mililitro respecto a la no activada.

Estos resultados antes declarados no concuerdan con los reportados por Rivera y Pinto, (2001), al informar mortalidades de un 20 % para adultos del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* (Hustache)), usando una dosis de 5×10^9 conidios por ml, es válido aclarar que estos autores señalan que la cepa por ellos usadas no fue aislada a partir de ese insecto, al igual que los resultados de este trabajo donde la cepa fue aislada de la broca del café (*H. hampei*). La mortalidad puede ser afectada por este aspecto ya que el patógeno utilizado no presenta la misma capacidad de matar para los diferentes tipos de insectos, de ahí la importancia de activar las cepas al hacerles pases por los insectos diana para activar sus mecanismos de virulencia.

4.1.2 Determinación de la Concentración Letal media (CL 50 y CL 90)

La cepa, LBb 111 activada resultó dos veces más potente que la cepa sin activar al presentar una CL 50 de $7,500 \times 10^6$ conidios por ml, mientras la que la sin activar necesitaba una concentración de $1,400 \times 10^7$ para lograr esa mortalidad (Tabla 1). Estos resultados obtenidos fueron superiores a los de (Prado *et al.*, 2014) al evaluar cinco cepas de *B. bassiana* sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) con una mortalidad de 87 %. Es válido señalar que la concentración utilizada por estos autores fue de 1×10^8 .

Tabla 1. Concentración Letal media para las cepas LBb 111 en estudio.

	Bb 111	Bb111 Activada
CL 50	$1,400 \times 10^7$	$7,500 \times 10^6$
Límite Min.	$9,628 \times 10^6$	$4,600 \times 10^6$
Limite Máx.	$2,032 \times 10^7$	$11,00 \times 10^7$
CL 90	$3,582 \times 10^8$	$9,800 \times 10^7$

Al analizar los resultados obtenidos por el método estadístico Probit con grados de significancia de 0,05 se encontró que estos resultados no coinciden con los obtenidos por Lucero *et al.* (2004), donde los autores utilizaron la cepa con una

concentración letal 50 (CL50) de $6,1 \times 10^7$ esporas/ml y una concentración letal 90 (CL90) de $1,1 \times 10^{10}$ esporas/ml. Mientras que en la tabla 1 se muestra como los valores obtenidos fueron inferiores logrando una CL 90 de $9,800 \times 10^7$, muy por debajo de las referidas por los autores antes descritos.

Rojas *et al.* (2017), informaron CL 90 inferiores a las obtenidas en este trabajo ($9,5 \times 10^4$ y $6,7 \times 10^5$ conidios/ml), pero no alcanzaron los resultados propuestos y sugirieron que se requieran de mayores concentraciones a las evaluadas para generar la muerte del 90% de los individuos.

4.1.3 Determinación del Tiempo Letal medio (TL 50)

Por otro lado el Tiempo Letal Medio (TL 50) a una concentración de 5×10^7 de la cepa LBb 111 activada fue significativamente más corto con 5,90 días para matar el 50 % de los adultos del tetuán, mientras que a esa misma concentración cepa LBb 111 sin activar demoró 10,46 días para lograrlo (Tabla 2). De lo anterior expuesto se comprueba que la cepa LBb111 sin activar necesitó el doble del tiempo para matar al 50% de los insectos.

Estos resultados fueron superiores a los obtenidos por Sudres (2009), al reportar una mortalidad del 59,16 %, con una concentración de 1×10^7 pero en siete días

Tabla 2. Concentración Letal Media para las cepas Lbb 111 en estudio.

	Bb 111	Bb111 Activada
TL 50 a 5×10^7	10,46 días	5,90 días
Lim Mín TL 50	9,99 días	5,12 días
Lim Máx TL 50	2 días	6,71 días

Rivera y Pinto (2001), señalan que el tiempo menor en lograr la mortalidad puede estar relacionado al hecho de que la cepa fue reactivada en insectos previamente. Esta reactivación, de acuerdo con numerosos estudios, potencia la capacidad patogénica de un aislamiento fúngico. Por su parte González *et al.* (1994), encontraron un mayor porcentaje de mortalidad y un menor tiempo letal medio en

la broca del café, *H. hampei*, cuando utilizaron cepas del hongo *B. bassiana* reactivado en el insecto, al comparar con el mismo aislamiento sin reactivar.

4.2 Determinación de la eficacia de la cepa LBb 111 después del proceso de activación.

La eficacia obtenida está en correspondencia con la mortalidad descrita anteriormente donde las concentraciones 5×10^7 , 5×10^5 y 5×10^4 fueron las que alcanzaron en las cepas activadas un mayor valor de mortalidad en relación a las no activadas, demostrando así resultados superiores de eficiencia (Figura 2). En el tratamiento de 5×10^5 se alcanzaron los valores más altos con diferencias con el resto de los tratamientos, seguido por 5×10^4 , lo que demuestra que cuando las concentraciones son bajas pueden propiciar un mejor control que cepas con igual concentración pero no activadas.

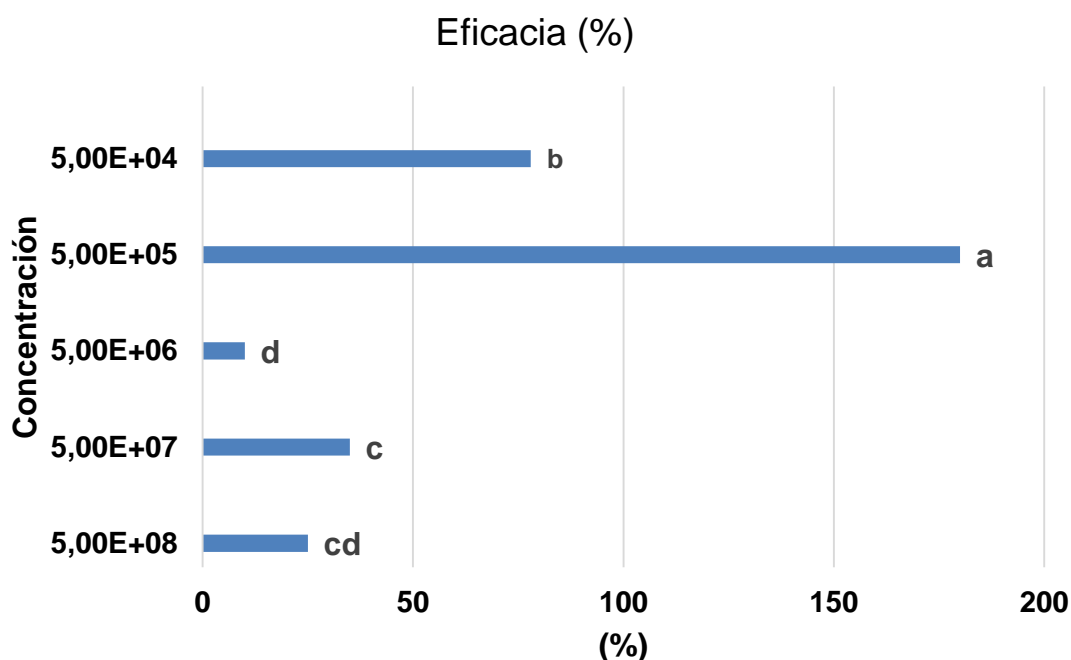


Figura 2. Eficacia de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* activada sobre *C. formicarius*

Este resultado tiene una gran utilidad práctica ya que cuando las cepas son activadas se pueden reducir las concentraciones con resultados de mortalidad superior, lo que favorece al productor desde el punto de vista económico y ecológico.

Los valores expresados en la presente investigación son concordantes con los obtenidos en estudios anteriores por Nicolás *et al.* (2011), aunque estos autores lograron una mayor eficacia en medios de cultivos con hidrocarburos.

CONCLUSIONES

1. La mortalidad de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* activada resultó dos veces más potente que la cepa sin activar al presentar una CL 50 de $7,500 \times 10^6$
2. La cepa LBb 111 de *B. bassiana* sin activar necesitó el doble del tiempo para matar al 50% de los insectos.
3. La activación de la cepa LBb 111 de *B. bassiana* demostró una mayor eficacia, donde las concentraciones 5×10^7 , 5×10^5 y 5×10^4 fueron las que alcanzaron los mayores valores en relación a la cepa no activada.

RECOMENDACIONES

1. Continuar con la activación de la cepa sobre *H. hampei*, insecto sobre el cual fue aislado el hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa LBb 111.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, SB; Pereira, RM; Stimac, JL; Viera, SA. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 6 (4):575-585.
- Alves, SB;Pereira,RM.1998.Producao de fungos entomopatogenicos. In Alves, SB. Ed. Controle microbiano de insetos 2.ed.Piracicaba,Brasil, FEALQ.p. 845-869.
- Bahamón, T; Aycardi, E; Orozco, J; Marin, P; Bustillo, AE. 2001 . Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3 (1):80Ð90.
- Bustillo, A., & Marin, P. (2002). Cómo reactivar la virulencia de *B. bassiana* para el control de Broca de Café. *Manejo Integrado de Plagas*, 40(63), 1-4.
- Castellón, M., García, Y., Rojas, X., & Cartaya, G. (2015). Reconocimiento de organismos plagas presentes en raíces tuberosas de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) lam. rev. *Agricultura Tropical*, Vol. 1(No. 1), 66-69.
- Castillo, C., Cañizales, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Solbey , M. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria* aislada de diferentes insectos en trujillo-Venezuela. *Revista ACADEMIA, Volumen XI* (23), págs. 275-281.
- FAO. 2009. Anuario. Producción. Batatas. Colección FAO. Estadística 142 (51). p 86.
- González,MT;Posada,FJ;Bustillo, AE.1993.Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Revista Cenicaf (Colombia)* 44 (3):93-102.
- Huamán, Z. 1992. Botánica Sistemática y Morfología de la Planta Batata o Camote. Boletín de Información Técnica CIP (TIBs). no 25. Lima, Perú.
- Martínez, E.; Barrios, G.; Rovesti, L. y Santos, R.: Manejo integrado de plagas, manual práctico. 1ra ed. CNSV-GVC-Entre pueblos. Impreso GrupBev. Tarragona, España, p 75-80. 2007.

- Maza, N., Morales, A., Ortiz, O., Winters, P., Alcazar, J., & Scott, G. (2000). *Impacto del manejo integrado del manejo integrado del tetúan de boniato (Cylas formicarius) en Cuba*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Instituto de Investigaciones en Viandas Tropical. Santa Clara. Cuba: INIVIT.
- Mendez Salazar, A. (2008). Efecto del hongo *Beauveria bassiana* B. en el control del gorgojo (*Euscepes postfasciatus* F.) del camote (*Ipomoea batata* L.). La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andres.
- Morales T, A. 2001. Aspectos generales sobre el cultivo del camote (boniato) en Cuba / Alfredo M. T., E, N. Maza. En Manejo Integrado del Gorgojo del Camote o Tetuán del boniato, *Cylas formicarius* (Fab.), en Cuba. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). P: 1-11.
- Rebolledo, O., Lezama Gutierrez, R., Contreras, D., Morales , E., & Tellez, G. (2014). Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) en adultos del escarabajo *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) de casetas avícolas del estado de Colima. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 87-93.
- Rivera, G., & Pinto, L. (2001). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache). *Revista colombiana de biotecnología*, 3(2).
- Rodríguez Nodals, A; A, Rodríguez y A, Rodríguez. 2003. Tecnologías para los huertos intensivos, en rotación con hortalizas, MINAGRI –Grupo nacional de Agricultura Urbana, La Habana, 12 pp.
- De Candole, P. 1972. La yuca, la batata y la patata, reseña sobre sus orígenes. Folleto. Inédito.
- López, M Edith Vázquez R. López 1995. Raíces tubérculos. Ed. Educación. Ciudad de La Habana.312p.
- Soto, M. Orígenes de algunas plantas centroamericanas. Turrialba. 1992.
- Roig, J. 1968. Diccionario botánico de nombres vulgares. Ed. Cient. Técnica. P 43 T I.
- CIP, 2002. The use of batata doce: facts and perspectives en : <http://www.cip.org>

